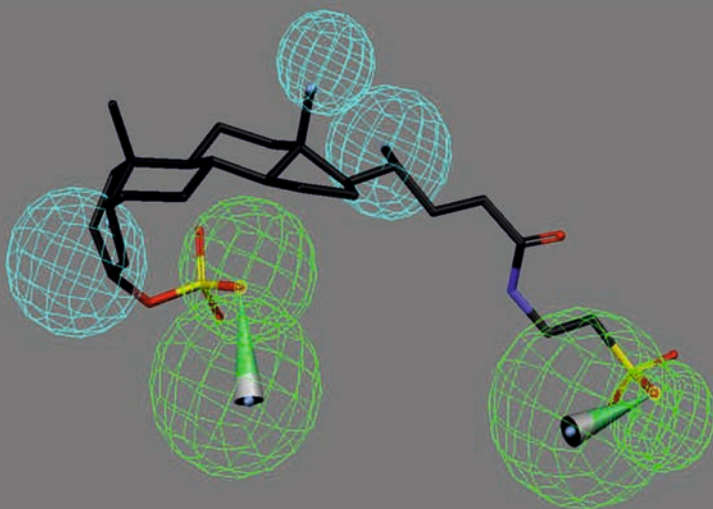


Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter SOAT: Gewebeexpression, vergleichende funktionelle Charakterisierung und Generierung einer 3D-QSAR Pharmakophore

GARY GROSSER



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

**Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter
SOAT: Gewebeexpression, vergleichende
funktionelle Charakterisierung und Generierung
einer 3D-QSAR Pharmakophore**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Gary Grosser

Tierarzt aus Mannheim

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. J. Geyer

PD Dr. S. Tacke

Tag der Disputation: 31.01.2013

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	V
Verzeichnis der Tabellen	VIII
Abkürzungen	IX
Darstellung der allgemeinen Gallensäure- bzw. Steroidstruktur	XII
Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	XIII
Der genetische Code.....	XIII
Vorsätze im Dezimalsystem.....	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Membrantransport	1
1.2 Die SLC10- Familie	3
1.3 Das Na ⁺ /Taurocholat Cotransporting Polypeptide (NTCP, SLC10A1).....	5
1.3.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften	5
1.3.2 Gewebeexpression und Funktion	5
1.3.3 Pharmakologische Bedeutung des NTCP/Ntcp	6
1.4 Der Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter (ASBT, SLC10A2)	7
1.4.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften	7
1.4.2 Gewebeexpression und Funktion	7
1.4.3 Pharmakologische Bedeutung des ASBT/Asbt	9
1.5 Der enterohepatische Kreislauf	10
1.6 Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT, SLC10A6).....	13
1.6.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften des SOAT	13
1.6.2 Gewebeexpression und mögliche Funktion	13
1.6.3 Steroidsulfate und deren enzymatische Umwandlung	14
1.7 Weitere Mitglieder der SLC10-Familie	15
1.7.1 SLC10A3	15
1.7.2 SLC10A4	15
1.7.3 SLC10A5	16
1.7.4 SLC10A7	16
1.8 Zielsetzung.....	17
2 Material	18
2.1 Materialien für die Molekularbiologie	18
2.1.1 Primer	18
2.1.2 Enzyme.....	18
2.1.3 Vektoren	19
2.1.4 Bakterienstämme.....	21
2.1.5 qPCR	21
2.1.6 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien	22
2.1.7 Puffer und Medien	23
2.2 Agarose-Gelelektrophoresen.....	23
2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese (DNA)	23
2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA)	24
2.2.3 Längenstandards.....	24
2.3 Zellkultur	25
2.3.1 Zelllinien	25
2.3.2 Zellkulturmedien	25
2.3.3 Antibiotika	26
2.4 Transportmessungen an eukaryotischen Zellen	26
2.4.1 Puffer und Lösungen	26
2.4.2 Proteinbestimmung.....	26

2.5	Dünnschichtchromatographie	27
2.6	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	27
2.7	Immunfluoreszenz	28
2.7.1	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen	28
2.8	Immunhistochemie	28
2.8.1	Material, Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie	29
2.9	Proteinanalyse	30
2.9.1	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine)	30
2.9.2	Puffer und Lösungen für Western Blot	30
2.9.3	Filmentwicklung	31
2.9.4	Kommerziell erhältliche Kits	31
2.9.5	Längenstandards	31
2.10	Chemische Substanzen	32
2.10.1	Reagenzien	32
2.10.2	Feinchemikalien	34
2.10.3	Radioaktiv-markierte Substanzen	36
2.11	Geräte	37
2.12	Verbrauchsmaterial	38
2.13	Bioinformatische Programme und Datenbanken	39
3	Methoden	42
3.1	Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie	42
3.1.1	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	42
3.1.2	Native Agarose-Gelelektrophorese	42
3.1.3	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	43
3.1.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
3.1.5	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	43
3.1.6	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab	44
3.1.7	Plasmid-Präparationen im Midi-Maßstab	44
3.2	Isolierung und Aufarbeitung von RNA	45
3.2.1	Mäuse und Organentnahme	45
3.2.2	Isolierung von Total-RNA aus Geweben	45
3.2.3	Isolierung von Total-RNA aus Zellen	46
3.2.4	Aufreinigung von polyA ⁺ -RNA aus Total-RNA	47
3.2.5	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.6	DNase Verdau	48
3.2.7	cDNA-Synthese aus Total- und poly A ⁺ -RNA	49
3.2.8	Laser-assisted cell picking (LACP) und Extraktion von RNA	49
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
3.3.1	Allgemeine Regeln zur Primerauswahl	51
3.3.2	PCR-Reaktionsansatz	52
3.3.3	Touchdown-PCR	53
3.3.4	Nested-PCR	53
3.3.5	RACE-PCR	53
3.3.6	Quantitative Real-Time PCR	54
3.4	DNA-Klonierung	56
3.4.1	TOPO-Klonierung	56
3.4.2	Transformation	56
3.4.3	Die Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression	57
3.5	Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren	57
3.6	Zellbiologische Methoden	58
3.6.1	Passagieren und Aussäen der Zellen	58
3.6.2	Einfrieren der Zellen	58
3.6.3	Auftauen der Zellen	58
3.7	Transportmessung an HEK293-Zellen	59
3.7.1	Versuchsvorbereitung	59
3.7.2	Transportmessung	59
3.7.3	cis-Hemmung und Ermittlung der IC ₅₀ -Werte	60
3.7.4	Flüssigszintillationsmessung	60
3.7.5	Proteinbestimmung	61

3.7.6	Auswertung der Aufnahmeversuche	61
3.8	Immunfluoreszenz	61
3.8.1	Herstellung des mSoat ₃₁₇₋₃₃₁ - und des mSoat ₃₂₉₋₃₄₄ -Antikörpers.....	62
3.8.2	Indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen mSoat-Antikörpern.....	63
3.8.3	Mikroskopie	64
3.9	Immunhistochemie	64
3.9.1	Herstellung histologischer Schnitte	65
3.9.2	Immunhistochemische Aufbereitung und Färbung.....	65
3.10	Western Blot.....	66
3.10.1	Proteinaufbereitung	66
3.10.2	Proteinbestimmung.....	67
3.10.3	Gellauf und Blotting	67
3.10.4	Blockierung der Membran und Antikörperreaktion	68
3.10.5	Detektion	68
3.11	Dünnschichtchromatographie	69
4	Ergebnisse	71
4.1	Funktionelle Charakterisierung des murinen Soat (mSoat).....	71
4.1.1	Sequenzanalyse des murinen Soat.....	71
4.1.2	Membranexpression und -topologie	73
4.1.3	Expression des mSoat und des Androgenrezeptors der Maus (mAr).....	75
4.1.4	Immunhistochemischer Nachweis von mSoat in Geweben	79
4.1.5	Zeit- und Natrium-abhängige Aufnahme von mSoat-Substraten	81
4.1.6	Kinetische Bestimmung des mSoat- vermittelten Transportes	82
4.1.7	Cis-Hemmungen des mSoat	85
4.2	Der Soat des Schweins (susSoat).....	88
4.2.1	Sequenzbestimmung des susSoat.....	88
4.2.2	Quantitative Bestimmung des Soat im Hoden des Schweins	90
4.3	Substratvergleich der SLC10-Carrier NTCP, ASBT und SOAT.....	92
4.3.1	Untersuchung der Expression an stabil transfizierten Zelllinien durch quantitative Real-Time PCR	92
4.3.2	Substratprofil von NTCP, ASBT und SOAT	93
4.3.3	Kinetische Transportbestimmungen für NTCP, ASBT und SOAT	99
4.3.4	Kontrolle der Gallensäuren durch Dünnschichtchromatographie	104
4.3.5	Aufnahmeversuche mit Taurolithocholat-3-sulfat.....	106
4.4	Generierung eines 3D-QSAR Pharmakophormodells für SOAT	110
4.4.1	Bestimmung von IC ₅₀ - Werten.....	110
4.4.2	Initiales Screening	111
4.4.3	Erstellen der SOAT-Pharmakophore.....	114
4.4.4	Validierung der SOAT-Pharmakophorhypothese.....	118
4.4.5	Vergleich der IC ₅₀ -Werte des <i>training set</i> von cASBT und SOAT.....	120
4.4.6	Stimulierende Effekte	122
5	Diskussion.....	124
5.1	Charakterisierung des mSoat	124
5.1.1	Sequenzanalyse, Membrantopologie und <i>in silico</i> Promotoranalyse von mSoat und SOAT im Vergleich.....	124
5.1.2	Transporteigenschaften und inhibitorisches Profil von mSoat und SOAT im Vergleich	126
5.1.3	Expression von mSoat und SOAT.....	128
5.1.4	Physiologische Bedeutung des mSoat/SOAT	129
5.2	Der Soat des Schweins	132
5.2.1	Verwandschaftsanalyse der SLC10A6-Familienmitglieder	132
5.2.2	Die physiologische Rolle des susSoat	134
5.3	Substratvergleich von SOAT, NTCP und ASBT	134
5.3.1	Das Substratprofil von SOAT, NTCP und ASBT	135
5.3.2	Funktionelle Gruppen der Substraterkennung	137
5.4	Vergleich der Pharmakophormodelle und des inhibitorischen Profils von SOAT, ASBT und NTCP	140

5.4.1	Die Bedeutung eines Pharmakophormodells.....	140
5.4.2	Die Rolle und Erstellung des SOAT- Pharmakophormodells.....	141
5.4.3	Vergleich der Pharmakophoren von SOAT und cAsbt/ASBT	143
5.4.4	Vergleich der Pharmakophoren von SOAT und NTCP bzw. NTCP und ASBT	147
5.4.5	Stimulierende Effekte	148
6	Zusammenfassung	156
7	Summary	157
8	Literaturverzeichnis	159
9	Danksagungen	176

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1:	Klassifizierung der SLC-Familie in Uniporter, Antiporter und Symporter, der ABC-Familie in Effluxcarrier und der Kanäle in Aquaporine und Ionenkanäle	2
Abb. 1.2:	Bayesian Protein-Stammbaum der SLC10-Familie.	4
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren.	12
Abb. 3.1:	Überprüfung der Antigenität der Peptid-aufgereinigten Antikörper mSoat ₃₁₇₋₃₃₁ - und mSoat ₃₂₉₋₃₄₄ mittels indirektem ELISA.	63
Abb. 3.2:	Aufbau des Semi-Dry Elektroblob Gelsandwiches.....	68
Abb. 3.3:	Ansicht einer mit Bleistift markierten 60F-254-Dünnschicht-Kieselgelplatte.....	69
Abb. 4.1:	Alignment der Proteinsequenzen von mSoat, rSoat und SOAT	72
Abb. 4.2:	Nachweis der Membranexpression des mSoat-Proteins mittels Immunfluoreszenz	75
Abb. 4.3:	Standardkurve zur Bestimmung der Effizienz und des dynamischen Bereichs.....	76
Abb. 4.4:	Expressionsprofil von mSoat in murinem Gewebe	77
Abb. 4.5:	Validierung der mSoat-Expression in Haut, Hoden, Lunge, Nebenhoden und Gehirn von CF-1, C57BL/6-J, FVB/N und 129Sv-Mäusen	78
Abb. 4.6:	Qualitative RT-PCR von mSoat und mHprt1	78
Abb. 4.7:	Qualitative RT-PCR von mAr und mHprt1	79
Abb. 4.8:	Immunhistochemische Lokalisation des mSoat im Hoden einer C57BL/6-J Maus.....	80
Abb. 4.9:	Zeit- und Natrium-abhängige Aufnahme von Steroidsulfaten in mSoat-HEK293-Zellen	81
Abb. 4.10:	Initiale Aufnahmegeschwindigkeit von PREGS in mSoat-HEK293-Zellen	82
Abb. 4.11:	Konzentrationsabhängiger Transport von DHEAS, E ₁ S und PREGS in mSoat-HEK 293-Zellen	84
Abb. 4.12:	Inhibitorische Wirksamkeit von sulfatierten und freien Steroiden, Gallensäuren, Organosulfaten, u.a. auf den Transport von PREGS in mSoat-HEK293-Zellen.	86
Abb. 4.13:	Hemmung des PREGS-Transportes in mSoat-HEK293-Zellen durch chemische Strukturen, die als <i>training set</i> für die Erstellung der 3D-QSAR cAsbt-Pharmakophore verwendet wurden.....	87
Abb. 4.14:	Alignment der Proteinsequenzen des SOAT/Soat von Mensch, Hund, Pferd, Rind, Schwein, Maus und Ratte.....	89
Abb. 4.15:	Standardkurve zur Bestimmung der Effizienz (in R ²) und des dynamischen Bereichs der Assays	91
Abb. 4.16:	Expression von susSoat im Hoden eines 50 und eines 250 Tage alten Schweins mit susHprt1 als endogene Kontrolle.	92
Abb. 4.17:	Überprüfung der Expression der stabil transfizierten HEK293-Zelllinien und der FlpIn-HEK293-Kontrollzelllinie mittels quantitativer Real-Time PCR	93
Abb. 4.18:	Natrium-abhängige Aufnahme von sulfatierten Steroidhormonen in stabil transfizierten NTCP-, SOAT-, ASBT-HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle).	94
Abb. 4.19:	Natrium-abhängige Aufnahme von je 1 µM Cortison, Cortisol, Estron-3β-D-glucuronid und 100 nM Estradiol-17β-D-glucuronid.....	94
Abb. 4.20:	Zeitabhängige Aufnahme (links) von 1 µM Estron-3β-D-glucuronid und Inhibition mit 10 µM und 100 µM TC (rechts) in stabil transfizierten NTCP- HEK293-Zellen.	95
Abb. 4.21:	Natrium-abhängige Aufnahme der unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Chenodeoxycholat, Deoxycholat, Ursodeoxycholat, Lithocholat und der konjugierten Gallensäure Sarkosincholat	96

Abb. 4.22: Natrium-abhängige Aufnahme von 1 μ M Glycin-konjugierten Gallensäuren Glycochololat, Glycodeoxychololat, Glycochenodeoxychololat und Glycoursodeoxychololat in stabil transfizierte NTCP-, SOAT-, ASBT- HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen	97
Abb. 4.23: Natrium-abhängige Aufnahme von 1 μ M der mit Taurin-konjugierten Gallensäuren Taurochololat, Taurolithochololat, Taurodeoxychololat, Taurochenodeoxychololat und Tauroursodeoxychololat	97
Abb. 4.24: Zeitabhängige Aufnahme von TLC	98
Abb. 4.25: Inhibition von 200 nM TLC mit 2 μ M und 20 μ M TC oder DHEAS in stabil transfizierten NTCP-, ASBT- und SOAT-HEK293-Zellen	99
Abb. 4.26: Konzentrationsabhängiger Transport von DHEAS, E ₁ S und PREGS in NTCP-HEK293- Zellen.	102
Abb. 4.27: Konzentrationsabhängiger Transport von TLC in NTCP-, ASBT-, und SOAT-HEK293-Zellen.	103
Abb. 4.28: Konzentrationsabhängiger Transport von TC in NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen.	104
Abb. 4.29: Dünnschichtchromatographie zur Überprüfung der Reinheit der zur Verfügung gestellten Gallensäuren.	105
Abb. 4.30: Aufnahme von 1 μ M TLCS in stabil transfizierten NTCP-, SOAT-, ASBT-HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen	106
Abb. 4.31: Dünnschichtchromatographische Analyse der in Alkohol gelösten unaufgereinigten Stammlösung von [³ H]TLCS.	106
Abb. 4.32: Dünnschichtchromatographische Analyse	109
Abb. 4.33: Dünnschichtchromatographische Analyse der für Transportversuche angesetzten natriumhaltigen, wässrigen Messlösung von TLCS	108
Abb. 4.34: Aufnahme von 1 μ M Taurolithochololat-3-sulfat nach dünnschichtchromatographischer Aufreinigung in stabil transfizierte NTCP-, SOAT-, ASBT- HEK293-Zellen.	109
Abb. 4.35: Aufnahme von 1 μ M Taurin in stabil transfizierten SOAT-HEK293-Zellen	110
Abb. 4.36: Bestimmung von IC ₅₀ Werten (Beispiel Taurolithochololat)	111
Abb. 4.37: Darstellung der chemischen Strukturen, welche als „training set“ (s. Tab. 4.12) für die Erstellung des SOAT-Pharmakophormodells verwendet wurden.	115
Abb. 4.38: Pharmakophormodell des humanen SOAT	116
Abb. 4.39: Korrelation der <i>in silico</i> geschätzten IC ₅₀ -Werte (μ M) im Vergleich zu den experimentell ermittelten Werten der Substanzen des <i>training set</i> auf Grundlage der berechneten Pharmakophore.	117
Abb. 4.40: Die Gallensäure Taurolithochololat-3-sulfat (TLCS), eingefügt in das SOAT-Pharmakophormodell.	117
Abb. 4.41: BSP eingefügt in das SOAT-Pharmakophormodell.	118
Abb. 4.42: S 1647 eingefügt in das SOAT-Pharmakophormodell.	118
Abb. 4.43: Chemische Strukturen der für die Validierung der SOAT-Pharmakophore verwendeten Substanzen.	119
Abb. 4.44: Chemische Strukturen von Substanzen, die als <i>training set</i> für die Erstellung der 3D-QSAR cAsbt-Pharmakophore verwendet wurden und auch auf SOAT-Inhibition getestet wurden.	120
Abb. 4.45: Korrelation der gemessenen IC ₅₀ -Werte	121
Abb. 4.46: Stimulierender Effekt von Substanzen auf die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293 Zellen.	122
Abb. 4.47: Stimulierender Effekt von Substanzen auf die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293 Zellen mit nachfolgender Wiederabnahme bzw. Inhibition.	123

Abb. 5.1: Genomische Organisation der SLC10 Transporter ASBT, SOAT und NTCP von Mensch, Ratte und Maus.	125
Abb. 5.2: $\Delta 4$ - und $\Delta 5$ - Wege der Steroidhormonsynthese.	127
Abb. 5.3: Immunhistochemische Lokalisation des mAr in der Lunge einer männlichen FVB-Maus	130
Abb. 5.4: Verwandtschaftsdiagramm der SLC10A6-Familienmitglieder	133
Abb. 5.5: Strukturanforderungen der funktionellen Gruppen von Gallensäuren und Steroidhormonen, die zur Substraterkennung notwendig sind.....	138
Abb. 5.6: Räumliche Anforderung von Steroidsulfaten, Gallensäuren und die Überlagerung der SOAT-Substrate DHEAS (gelb) und TLC (grün)	139
Abb. 5.7: Inhibitorische Veränderungen der SOAT spezifischen DHEAS-Aufnahme durch Substitution verschiedener funktioneller Gruppen bzw. Atome an einer Gallensäurestruktur	142
Abb. 5.8: Pharmakophormodell vom Asbt des Kaninchens (cAsbt).....	145
Abb. 5.9: Taurocholat eingefügt in das Pharmakophormodell des cAsbt.....	145
Abb. 5.10: Pharmakophore des humanen ASBT.	147
Abb. 5.11: Pharmakophormodell des NTCP	148
Abb. 5.12: Vergleich der funktionellen Gruppen und Bereiche, die für eine Stimulation des SOAT verantwortlich sind.....	151
Abb. 5.13: Beispielhafte Berechnung der Michaeliskonstante K_m bei normaler Aufnahme eines Substrats bzw. bei Zugabe einer stimulativen Substanz unter Voraussetzung eines allosterischen Mechanismus.	153
Abb. 5.14: Theorie der <i>Trans</i> - und <i>Cis</i> -Stimulation des SOAT.....	155

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 4.1: Exon/Intron-Organisation des murinen Slc10a6-Gens	71
Tab. 4.2: <i>In silico</i> Promotoranalyse von SOAT, mSoat und rSoat.	73
Tab. 4.3: Vergleich der Membrantopologie des murinen Soat nach Voraussage verschiedener bioinformatischer Programme	73
Tab. 4.4: Transportkinetische Parameter von DHEAS, E ₁ S und PREGS in stabil transfizierten mSoat-HEK293-Zellen	83
Tab. 4.5: Exon/Intron-Organisation des Slc10a6 des Schweins	89
Tab. 4.6: Transportkinetische Parameter von DHEAS, E ₁ S und PREGS in stabil transfizierten NTCP-HEK293-Zellen	100
Tab. 4.7: Transportkinetische Parameter von TLC in stabil transfizierten NTCP-, ASBT- und SOAT -HEK293-Zellen	101
Tab. 4.8: Transportkinetische Parameter von TC in stabil transfizierten NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen	101
Tab. 4.9: Inhibitorische Wirkung von Gallensäuren auf den Transport von [³ H]DHEAS durch SOAT	112
Tab. 4.10: Inhibitorische Wirkung von Steroidhormonen und Substanzen mit Steroidstruktur auf den Transport von 200 nM [³ H]DHEAS durch SOAT.	113
Tab. 4.11: Inhibitorische Wirkung von Betulinderivaten auf den Transport von 200 nM [³ H]DHEAS durch SOAT	114
Tab. 4.12: <i>Training set</i> des SOAT-Pharmakophormodells	115
Tab. 4.13: Validierung des SOAT-Pharmakophormodells	119
Tab. 4.14: Vergleich der IC ₅₀ -Werte zwischen cAsbt und SOAT mit den zur Erstellung der cAsbt-Pharmakophore verwendeten Substanzen.	121
Tab. 5.1: Vergleich der Transportkinetiken von [³ H]DHEAS, [³ H]E ₁ S, und [³ H]PREGS von mSoat und SOAT	126
Tab. 5.2: Prozentuale Aminosäuresequenzidentität und Divergenz verschiedener SLC10A6 Familienmitglieder	133
Tab. 5.3: Substratprofil von SOAT, NTCP und ASBT	136
Tab. 5.4: Vergleichende transportkinetische Parameter von SOAT, NTCP und ASBT für DHEAS, E ₁ S, PREGS, TLC und TC	137

Abkürzungen

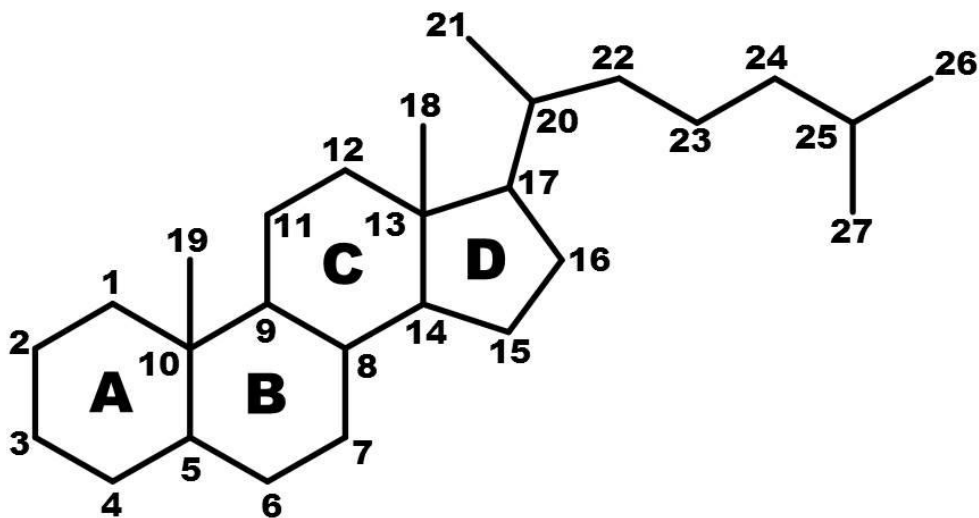
%	Prozent
λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	ATP Binding Cassette
ACTB	β-Aktin (human)
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ASBT/ISBT/IBAT	Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter/Ileal Sodium-dependent Bile salt Transporter/Ileal Bile Acid Transporter (human)
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BARI	Bile Acid Reabsorption Inhibitor
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BHK	Baby Hamster Kidney
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
b	Base
bp	Basenpaare, base pair
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serum Albumin
BSEP	Bile salt export pump
BSP	Bromsulfophthalein
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cAsbt	Apical sodium-dependent bile acid transporter (Kaninchen)
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
Ci	Curie
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CoMFA	Comparative Molecules Field Analysis
COS	<i>Cercopithecus aethiops</i> , origin-defective SV-40
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
cRNA	complementary RNA
C _T	Signal threshold cycle
CYP7A1	Cholesterol 7α-Hydroxylase
Da	Dalton
DABCO	Diazobicyclooctan
DAPI	4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-3-sulfat
DHT	Dihydrotestosteron
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
EB	Ethidiumbromid

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay analysis
ER	Estrogenrezeptor
E ₁ S	Estron-3-sulfat
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
FRT	Flp Recombinase Target
FXR	Farnesoid X receptor
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GOI	Gene of interest
GP	Large taking of blood
GR	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGNC	HUGO Nomenclature Committee
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HUGO	Human Genome Organisation
IBABP/ILBP	Ileal Bile Acid Binding Protein/Ileal Lipid Binding Protein
IBAM	Idiopathic Bile Acid Malabsorption/ideopathische Gallensäure-Malabsorption
IC ₅₀	Hemmstoffkonzentration, welche die Aufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration um 50 % hemmt
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kap.	Kapitel
K _i	Hemmkonstante
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LACP	Laser-assisted cell picking
LB	Luria Bertani
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDL-R	Low-Density Lipoprotein Rezeptor
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mAr	Androgenrezeptor (Maus)
mB2m	β 2- microglobulin (Maus)
MCS	Multi Cloning Site
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MDR	Multidrug-resistance
MGB	Minor Groove Binder
mhprt1	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (Maus)
min	Minute
MLLV	Murine Moloney Leukaemia Virus
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance-Associated Protein
mSoat	Sodium-dependent organic anion transporter (Maus)
M.W.	Molecular weight
NaCl	Natriumchlorid

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTCP	Na ⁺ -Taurocholate Cotransporting Polypeptide (human)
OAT	Organic Anion Transporter
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxy-/Hydroxylgruppe
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
OSCP	Organic Solute Carrier Protein
OST	Organic Solute Transporter
OT	Objektträger
p	Plasmid
p.a.	pro analysi (hohe Reinheit)
PAH	<i>para</i> -Aminohippursäure
PBAM	Primary Bile Acid Malabsorption/Primäre Gallensäure-Malabsorption
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
PPI	Präimmunserum
PREGS	Pregnenolon-3-sulfat
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
(3D-)QSAR	(dreidimensionale) Quantitative Structure-Activity Relationship
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RLM	RNA ligase-mediated
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
rSoat	Sodium-dependent organic anion transporter (Ratte)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RXR	Retinoid X receptor
s	Sekunde
s.	siehe
SBAT	Sodium-Dependent Bile acid Transporter
SBF	Sodium Bile acid Family
SCO	Sertoli cell only
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEP	Sulfooxyethylpyrene
SLC	Solute Carrier
SMP	Sulfooxymethylpyrene
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter (human)
SSC	Sodium-chloride – Sodium Citrate solution
ST	Sulfotransferase
StS	Steroidsulfatase
susSoat	Sodium-dependent bile acid transporter (Schwein)
susHprt1	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (Schwein)
susTbp	TATA binding protein, transcription factor IID (Schwein)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
t-Asbt	trunkierter Apical sodium-dependent bile acid transporter
TC	Taurocholat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TLC	Taurolithocholat
TLCS	Taurolithocholat-3-sulfat
T _m	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TetO ₂	Tetrazyklin-Operator
TetR	Tetrazyklin-Repressor
TLCS	Taurolithocholat-3-sulfat
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _{max}	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
WT	Wildtyp

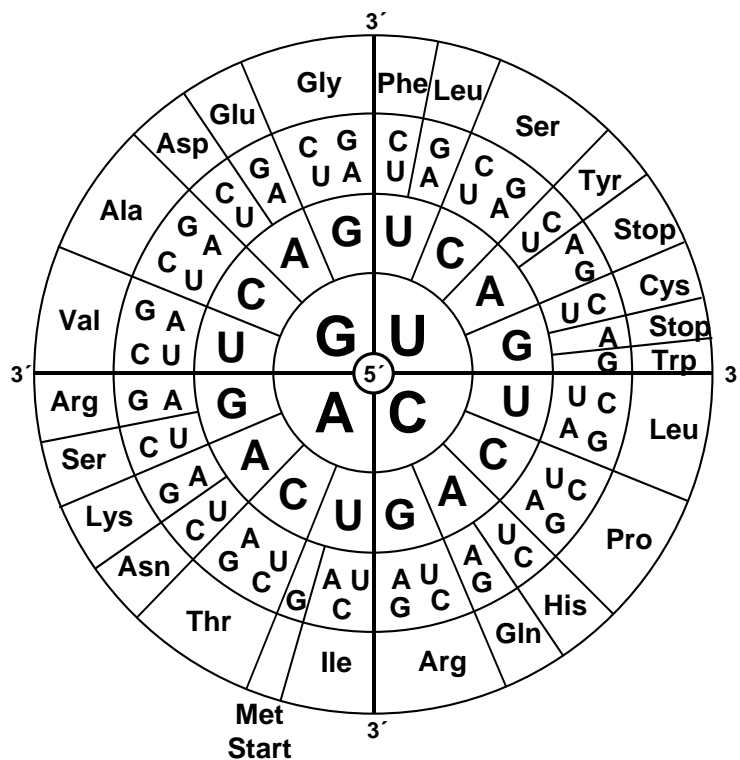
Darstellung der allgemeinen Gallensäure- bzw. Steroidstruktur (mit alphabetischer Bezeichnung der Ringe und aufsteigender Nummerierung der Kohlenstoff-Atome)



Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Der genetische Code



Vorsätze im Dezimalsystem

Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen	Potenz	Vorsilbe	Kurzzeichen
10^{15}	Peta	P	10^{-15}	Femto	f
10^{12}	Tera	T	10^{-12}	Piko	p
10^9	Giga	G	10^{-9}	Nano	n
10^6	Mega	M	10^{-6}	Mikro	μ
10^3	Kilo	k	10^{-3}	Milli	m
10^2	Hekto	h	10^{-2}	Centi	c

1 EINLEITUNG

1.1 Membrantransport

Für die Funktion einer Zelle ist es von immenser Bedeutung, dass nur Substanzen bzw. Moleküle, die wirklich in die Zelle hinein oder hinaus gelangen sollen, die biologische Zellmembran passieren können. So wird eine gezielte Zusammensetzung des Zytoplasmas gewährleistet, und die Zelle ist in der Lage, ihre spezifischen Aufgaben zu verrichten. Deshalb kommt dem Stofftransport durch die Zellmembran eine große Bedeutung zu. Während die aus einer Phospholipid-Doppelschicht bestehende Zellmembran für lipophile Substanzen wie z.B. unkonjugierte Steroidhormone aber auch Gase permeabel ist, sind polare Substanzen und größere Moleküle auf die Hilfe von verschiedenen Transportsystemen angewiesen. Diese sind Voraussetzung für viele Prozesse wie der Energietransduktion oder dem Stoff- und Informationsaustausch der Zellen. Bei der Endo- und Exozytose, dem sog. vesikulären Transport, werden vor allem hochmolekulare Moleküle wie z.B. Proteine von der Zellmembran eingeschnürt und von der Zelle aufgenommen (Vassilieva und Nusrat 2008; Deitcher 2002).

Kanäle, die eine hohe Spezifität zu ihren Substraten besitzen, ermöglichen z.B. Ionen wie Kalium, Natrium oder Chlorid, die Zellmembran zu passieren (Rahamimoff et al. 1999). Die Spezifität beruht hierbei sowohl auf der Ladung der Ionen als auch auf deren Hydrathülle. Dabei erfolgt der Fluss durch Kanalproteine erheblich schneller als beim Carrier-vermittelten Transport. Ansonsten unterscheidet man zwischen passivem und aktivem Transport. Beim passiven Transport folgen nicht-polare lipophile Moleküle durch einfache physikalische Diffusion ohne Energieverbrauch einem Konzentrationsgradienten, der nicht sättigbar ist. Aber auch Wasser durchdringt auf Grund seines geringen Molekulargewichts die Zellmembran durch passive physikalische Diffusion. Zusätzlich wird Wasser durch spezielle Poren, den Aquaporinen, transportiert (Verkman und Mitra 2000).

Der Transport mit Hilfe von Carrierproteinen in der Zellmembran, durch welchen geladene sowie gut wasserlösliche Stoffe wie z.B. Glukose entlang ihres Konzentrationsgradienten aufgenommen werden können, wird als erleichterte Diffusion bezeichnet und ist sättigbar. Davon abzugrenzen ist der aktive Transport, der immer Carrier-vermittelt unter Energieverbrauch stattfindet und Substanzen auch entgegen eines Konzentrationsgradienten „pumpt“. Bei der Diffusion mittels Carrier lässt sich eine leicht erhöhte Diffusionsgeschwindigkeit feststellen, denn Carrier binden die zu transportierende Substanz spezifisch und geleiten sie mittels Konformationsänderungen durch die Membran. Carrier-vermittelte Diffusion lässt sich anhand der folgenden Kriterien leicht bestimmen: Zum einen muss das System absättigbar sein, d.h. oberhalb einer bestimmten Konzentrationsdifferenz ändert sich die Geschwindig-

keit der Diffusion trotz Konzentrationserhöhungen nicht mehr, da alle Carrier-Proteine maximal ausgelastet sind. Zum anderen ist die Aktivität des Proteins temperaturabhängig. Letztlich sollten sich Inhibitoren für einen Carrier finden lassen, die selektiv den Transport eines Substrates unterbinden. Carrier werden nach Art der Energetisierung in verschiedene Gruppen innerhalb *des transporter classification system* unterteilt (Seier 2000); dabei bilden die „Solute Carrier“ (SLC)-Familie und die „ATP binding cassette“ (ABC)-Familie zwei übergeordnete Superfamilien. Als primär aktiver Transport wird ein direkt an der Hydrolyse von ATP beteiligter Transport bezeichnet, wie dies z. B. bei der Na^+/K^+ -ATPase der Fall ist. Hier werden durch Hydrolyse von ATP Natriumionen aus der Zelle geschleust und gleichzeitig Kaliumionen ins Innere der Zelle gepumpt (Abb. 1.1).

Andere aktive Transportprozesse können den durch die Aktivität dieser Na^+/K^+ -ATPase aufgebauten physiologischen Na^+ -Gradienten für einen Na^+ /Substrat-Cotransport in die Zelle ausnutzen. Da die ATP-Hydrolyse nur indirekt an den Transportprozess gekoppelt ist, spricht man dann von einem sekundär aktiven Transportprozess. Transportproteine können außerdem nach ihrem Transportverhalten eingeteilt werden. Während Uniporter einzelne Moleküle durch erleichterte Diffusion transportieren, werden beim Symporter und Antiporter zwei verschiedene Moleküle gemeinsam bzw. in entgegengesetzter Richtung transportiert (Schwenk 1987; Geyer et al. 2006; Conde et al. 2010).

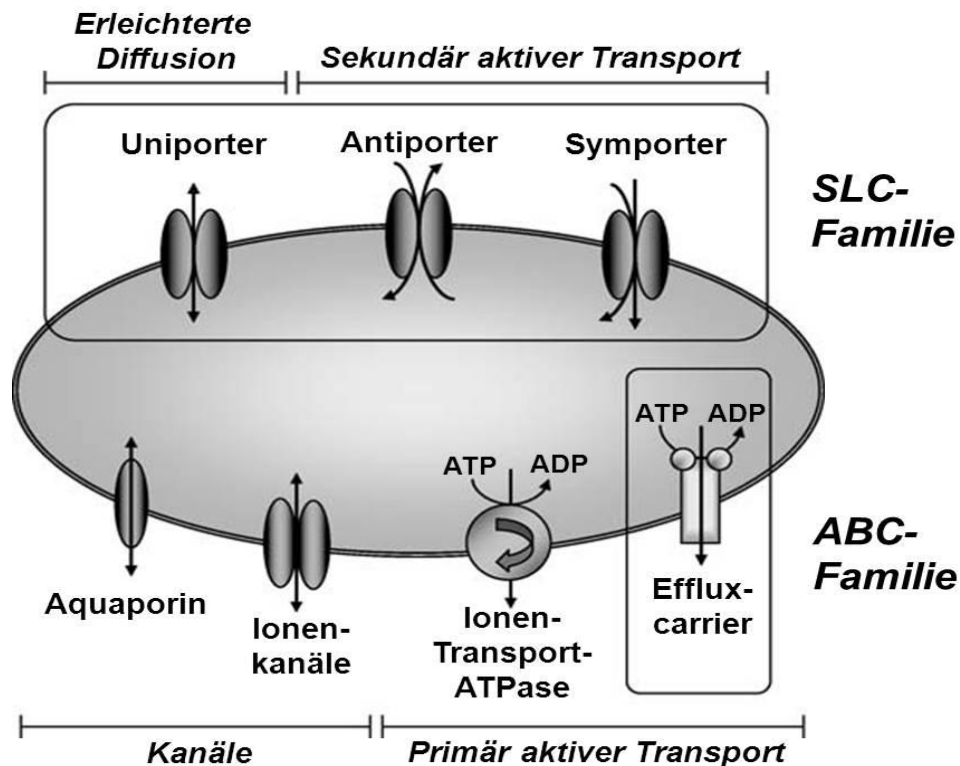


Abb. 1.1: Klassifizierung der SLC-Familie in Uniporter, Antiporter und Symporter, der ABC-Familie in Effluxcarrier und der Kanäle in Aquaporine und Ionenkanäle (Geyer et al. 2006).

1.2 Die SLC10- Familie

Alle bekannten humanen Gene werden durch das Human Genome Organisation (HUGO) Nomenclature Committee (HGNC) klassifiziert. Die Superfamilie der Solute Carrier umfasst derzeit 55 Genfamilien, die in der HGNC-Datenbank aufgeführt sind (He et al. 2009; www.bioparadigms.org/slc/intro.asp). Bei einer Sequenzhomologie von mind. 20 – 25 % zu bereits bekannten Mitgliedern einer SLC-Familie erfolgt die Zuordnung neu klonierter Transporter in diese Familie (Hediger et al. 2004). Bis zum Jahr 2004 bestand die SLC10-Familie, die auch „Sodium Bile Acid Cotransporter family“ (SBAT) genannt wird, aus zwei Gründungsmitgliedern, dem „Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide“ (NTCP, SLC10A1) und dem „Apical sodium-dependent Bile Acid Transporter“ (ASBT, SLC10A2) (Hagenbuch und Dawson 2004). Beide Carrier sind Natrium-abhängige Gallensäuretransporter, die den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren zwischen Leber (NTCP) und Dünndarm (ASBT) aufrechterhalten. Basierend auf bioinformatischen Vorhersagen und experimentellen Daten wird für den NTCP und ASBT ein Membrantopologiemodell mit 7 bis 9 Transmembrandomänen (TMD) mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus angenommen (Hagenbuch 1997; Hagenbuch und Meier 1994; Stieger et al. 1994; Dawson und Oelkers et al. 1995; Hallén et al. 1999; Hallén et al. 2002a,b; Zhang et al. 2004; Banerjee und Swaan 2006; Döring et al. 2012). Erst kürzlich wurde die Kristallstruktur des bakteriellen ASBT-Orthologs von *Neisseria Meningitidis* (ASBT_{NM}) entschlüsselt, welche eine 26 %ige AS-Sequenzidentität und 54 %ige Sequenzähnlichkeit zum humanen ASBT besitzt und einen Natrium-abhängigen Taurocholat-Transport zeigt (Hu et al. 2011). Die Kristallisation erfolgte unter Anwesenheit von Taurocholat und Natrium und die Röntgenanalyse demonstrierte eine inwärts gerichtete hydrophobe Aushöhlung, die von 10 TMDs mit intrazellulärem N- und C-Terminus umgeben war.

Weitere Mitglieder dieser Familie, SLC10A3 bis SLC10A7, wurden inzwischen kloniert und teilweise charakterisiert (Kap. 1.7); die physiologischen Funktionen sind derzeit jedoch noch unklar. Das bereits im Jahr 1988 isolierte Protein SLC10A3 wurde ebenfalls in diese Familie eingruppiert, da es zusammen mit SLC10A5 einem gemeinsamen Vorläufergen entspringt (Hagenbuch und Dawson 2004; Geyer et al. 2004, 2006, 2008; Fernandes et al. 2007; Godoy et al. 2007). Die Eingliederung des SLC10A7 in die SLC10 Familie muss jedoch kritisch betrachtet werden, da es nur eine 12 – 16 %ige Sequenzidentität (Godoy et al. 2007) statt der geforderten 20 – 25 % nach den Richtlinien des HGNC aufweist. Der „Sodium dependent Organic Anion Transporter“ SOAT (SLC10A6) wurde 2004 kloniert (Geyer et al. 2004) und wird vor allem in geschlechtsspezifischen Organen wie Hoden, Plazenta und Brustdrüse exprimiert (Geyer et al. 2006, 2007). Für SOAT konnte kein Gallensäuretransport festgestellt werden, dafür eine Natrium-abhängige Aufnahme von sulfokonjugierten

Steroiden, wie Estron-3-sulfat* (E₁S), Pregnenolon-3-sulfat (PREGS) und Dehydroepiandrosterone-3-sulfat (DHEAS) (Geyer et al. 2007). Innerhalb der SLC10-Familie zeigen ASBT und SOAT die höchste phylogenetische Verwandtschaft mit einer Sequenzidentität von 42 % auf Aminosäureebene. Somit umfasst die SLC10-Familie heute sechs Subfamilien, welche eine 19 bis 42 %ige Aminosäuresequenzidentität aufweisen (Abb. 1.2; Geyer et al. 2006). *In vitro* konnte eine Kolokalisation mit Heterodimerbildung von NTCP und SOAT, aber auch dem SLC10A4 gezeigt werden (Bijmans et al. 2012).

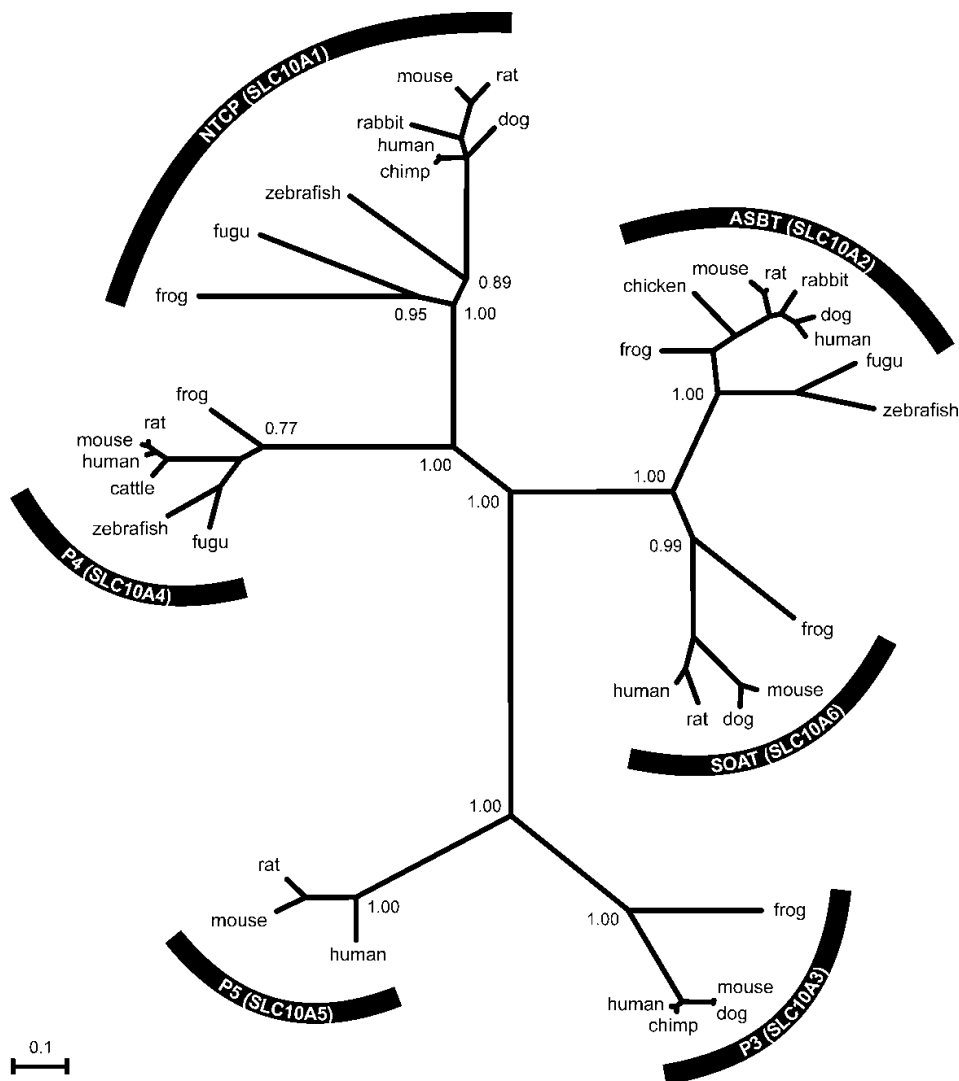


Abb. 1.2: Bayesian Protein-Stammbaum der SLC10-Familie.

Die SLC10-Familie besteht aus sechs Mitgliedern (SLC10A1 bis SLC10A6). Auf Proteinebene wird die phylogenetische Sequenzverwandtschaft der SLC10-Familienmitglieder gezeigt. Dog (*Canis familiaris*), frog (*Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*), cattle (*Bos taurus*), chimp (*Pan troglodytes*), fugu (*Fugu rubripes*), zebrafish (*Danio rerio*), chicken (*Gallus gallus*) (nach Geyer et al. 2006).

* Im Gesamtdokument wird die Estron-, Estradiol- bzw. Estrogen-Schreibweise (statt Östron, Östradiol und Östrogen) verwendet

1.3 Das Na⁺/Taurocholat Cotransporting Polypeptide (NTCP, SLC10A1)

Ntcp^{*} wurde erstmals im Jahr 1990 aus der Rattenleber kloniert und bildet ein Protein aus 362 Aminosäuren (AS). Das humane NTCP-Protein, aus 349 AS bestehend, zeigt eine Sequenzidentität von 77 % zum Ntcp der Ratte (Hagenbuch et al. 1990, 1991; Hagenbuch und Meier 1994). Die NTCP/Ntcp-Gene von Mensch, Ratte und Maus sind auf den Chromosomen 14p24, 6q24 und 12C3 lokalisiert (Hagenbuch und Meier 1994; Cohn et al. 1995; Green et al. 1998).

1.3.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften

Für NTCP/Ntcp konnte ein großes Substratspektrum nachgewiesen werden; es transportiert unkonjugierte sowie Taurin- und Glycinkonjugierte Gallensäuren (Boyer et al. 1994; Hagenbuch und Meier 1994; Hata et al. 2003; Kramer et al. 1999; Platte et al. 1996), außerdem sulfatierte Gallensäuren und, im Gegensatz zum ASBT, auch Steroidsulfate (Craddock et al. 1998; Kramer et al. 1999; Schroeder et al. 1998) und freie sowie konjugierte Schilddrüsenhormone (Friesema et al. 1999). Die sulfatierte Gallensäure Chenodeoxycholat-3-sulfat wird jedoch nur mit einer geringen Transportrate von NTCP aufgenommen (Craddock et al. 1998). Zum NTCP/Ntcp konnten Affinitäten für E₁S mit 27 µM und 60 µM ermittelt werden (Craddock et al. 1998; Ho et al. 2004; Schroeder et al. 1998). Die Stöchiometrie der Aufnahme beträgt 2 Na⁺:1 Gallensäure (Hagenbuch und Meier 1996; Weinman 1997). Zusätzlich konnte eine Aufnahme von Bromosulphophthalein (BSP), Chlorambucil-Taurocholat und einigen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-(HMG-CoA)-Reduktasehemmer wie Rosuvastatin gezeigt werden (Hata et al. 2003; Ho et al. 2006; Kullak-Ublick et al. 1997). NTCP/Ntcp interagiert mit einer großen Vielfalt an Arzneistoffen und Steroiden (Kim et al. 1999; Kouzuki et al. 1998, 2000; Kramer et al. 1999; Leslie et al. 2007; Mita et al. 2006), was eine Rolle bei der hepatobiliären Clearance von Arzneistoffen und deren Metaboliten vermuten lässt. Vieles spricht dafür, dass NTCP/Ntcp den Hauptteil des Na⁺-abhängigen Taurocholat-Transports in Hepatozyten vermittelt (Hagenbuch und Dawson 2004; Kullak-Ublick et al. 2004; Trauner und Boyer 2003).

1.3.2 Gewebeexpression und Funktion

NTCP/Ntcp wird spezifisch an der basolateralen (sinusoidalen) Membran von Hepatozyten exprimiert und sorgt dort für eine effiziente Na⁺-abhängige Aufnahme von Gallensäuren aus

* Zur Unterscheidung der Gene und Genprodukte von Mensch und anderen Spezies erfolgt die Nomenklatur in Groß- (Mensch) und Kleinbuchstaben (andere Spezies).

dem Portalblut (Ananthanarayanan et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1997; Stieger et al. 1994). Die Plasmakonzentration von Gallensäuren in der systemischen Zirkulation wird dadurch, dass NTCP die Gallensäuren in die Hepatozyten aufnimmt, niedrig gehalten. Die Gallensäuren werden danach hauptsächlich durch die Efflux-Carrier BSEP (bile salt excretory pump) und MRP2 (multi drug resistant protein 2) in die Galle transportiert. Die treibende Kraft des NTCP bildet dabei der einwärts gerichtete Na^+ -Gradient, welcher durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut wird. Verschiedene Mutationen und Polymorphismen (I223T, S267F, I279T und K314E) wurden im NTCP identifiziert, welche die Gallensäuretransportfunktion dramatisch reduzieren, oder sogar ganz blockieren (Wong et al. 1995; Oelkers et al. 1997; Ho et al. 2004). NTCP spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren (Kap. 1.5).

1.3.3 Pharmakologische Bedeutung des NTCP/Ntcp

Wegen seiner Leber-spezifischen Expression stellt NTCP ein wichtiges *drug target* für Arzneistoff-Gallensäure-Konjugate dar, um einen gezielten Transport von Arzneistoffen zur Leber zu erreichen (Kramer et al. 1992, 2011). Als besonders geeignet für eine Kopplung stellte sich die Position 3 des Sterangerüsts heraus, da diese gekoppelten Substanzen weiterhin als Substrat des NTCP erkannt wurden. Es wurden bereits Zytostatika (Chlorambucil) (Kramer et al. 1992; Kramer und Wess 1996; Kullak-Ublick et al. 1997), HMG-CoA-Reduktasehemmer (Kramer et al. 1994a), Peptide (Kramer et al. 1994b, 1997b; Petzinger et al. 1999) und Nukleotide (Lischka et al. 2003) an Gallensäuren als „Trojanisches Pferd“ gekoppelt und getestet (Enhsen et al. 1998; Petzinger und Kramer 2003; Döring et al. 2012). Am Beispiel Chlorambucil-Taurocholat wurde gezeigt, dass dieses Konjugat tatsächlich durch den humanen NTCP nach Expression in *Xenopus laevis* Oozyten transportiert wird (Kullak-Ublick et al. 1997). Auch Konjugate von Gallensäuren mit zytotoxischen Metallen (z.B. *cis*-Platin) wurden hergestellt, um eine Reduzierung des Tumorwachstums in der Leber und im Gallentrakt zu erreichen und der Nachweis des Transports durch NTCP konnte erbracht werden (Briz et al. 2002; Döring et al. 2012).

1.4 Der Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter (ASBT, SLC10A2)

Der Asbt wurde erstmals aus einer intestinalen cDNA-Bibliothek des Hamsters über Expressionsklonierung isoliert (Wong et al. 1994). Darauf erfolgte jeweils aus dem Ileum die Klonierung des humanen ASBT (Wong et al. 1995), des Asbt der Ratte (Shneider et al. 1995), des Asbt des Kaninchens (Kramer et al. 1999) und des Asbt der Maus (Saeki et al. 1999), die alle aus 349 AS bestehen und untereinander eine Sequenzhomologie von ca. 80 % aufweisen. Die Sequenzidentität zwischen ASBT und NTCP beträgt nur 35 %, zum SOAT zeigt er die höchste Homologie mit 41,8 %.

1.4.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften

Der ASBT transportiert, ähnlich wie der NTCP, alle physiologisch vorkommenden unkonjugierten und Glycin- und Taurin-konjugierten Gallensäuren mit hoher Affinität (Wong et al. 1994; Craddock et al. 1998; Kramer et al. 1999; Ho et al. 2006; Lionarons et al. 2012). Im Gegensatz zum NTCP transportiert der ASBT jedoch keine Steroidsulfate und Xenobiotika und zeigt somit ein eingeschränktes Substratspektrum (Craddock et al. 1998; Ho et al. 2006). Der Transport erfolgt wie beim NTCP Na^+ -abhängig mit einer Stöchiometrie von 2 Na^+ :1 Gallensäure (Craddock et al. 1998; Weinman et al. 1998). Es wird angenommen, dass die Bindung eines Na^+ -Ions zu einer Konformationsänderung des Proteins führt, die die Bindung des zweiten Na^+ -Ions erleichtert. Die daraus resultierende zusätzliche Konformationsänderung führt zur Bindung der Gallensäure mit anschließendem Transport von dieser zusammen mit den beiden Na^+ -Ionen (da Silva et al. 2011). Phylogenetisch interessant ist, dass sogar der Asbt vom Rochen Taurocholat transportiert und in Darm und Niere exprimiert wird (Lionarons et al. 2012).

1.4.2 Gewebeexpression und Funktion

ASBT wird, im Gegensatz zur basolateralen Lokalisation des NTCP, hauptsächlich in der apikalen Bürstensaummembran von Enterozyten im terminalen Ileum der Ratte (Shneider et al. 1995), der Maus (Dawson et al. 2003) und des Hamsters (Wong et al. 1994), beim Mensch zusätzlich im Duodenum (Hruz et al. 2006) exprimiert. Außerdem konnte eine Expression in den proximalen Tubuli der Niere nachgewiesen werden (Christie et al. 1996; Craddock et al. 1998), wo ASBT glomerulär filtrierte Gallensäuren reabsorbieren kann (Christie et al. 1996). Der Asbt der Ratte wird zusätzlich in der apikalen Membran von Cholangiozyten exprimiert (Alpini et al. 1997; Lazaridis et al. 1997) und könnte dort eventuell zusammen mit einer trunkierten Form des Asbt (t-Asbt) einen alternativen Weg für Gallensäuren zwischen Gallengang und Leber (*Cholehepatischer Shunt*) (Alpini et al. 2005)

vermitteln. Diese trunkierte Form des Asbt, bei der das Exon 2 fehlt und eine 119 bp Deletion zu einer Verschiebung des Leserahmens mit vorzeitigem Stoppcodon führt, wird im Ileum und in den Cholangiozyten sogar stärker exprimiert als der native Asbt. Das nur noch aus 154 AS bestehende t-Asbt-Protein vermittelt interessanterweise statt einer Aufnahme einen Efflux von Gallensäuren (Lazaridis et al. 2000). Der ASBT ist intrazellulär mit dem zytoplasmatischen „Ileal Lipid Binding Protein“ ILBP (auch Intestinal Bile Acid Binding Protein, IBABP, genannt) verbunden, welches die resorbierten Gallensäuren von der apikalen zur basolateralen Membrandomäne der Enterozyten transferiert (Stengelin et al. 1996; Kramer et al. 1997 a,b und 2001 a,b). Durch verschiedene Mutationen wird die funktionelle Bedeutung des ASBT im Dünndarm deutlich; diese können zu einem Funktionsverlust des Transporters führen und dadurch eine Gallensäuremalabsorption (PBAM, *Primary Bile Acid Malabsorption*), eine Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs von Gallensäuren mit intestinaler Funktionsstörung mit Diarrhoe und Steatorrhoe sowie eine Reduzierung des Plasma- *Low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterinspiegels bewirken (Wong et al. 1995; Oelkers et al. 1997). Verschiedene Mutationen konnten gefunden werden, die zu einem Verlust der Transportfunktion für Gallensäuren mit einhergehender PBAM führten. Ein einzelner Basenaustausch von Cytosin zu Thymin führte bei einem Patienten mit *Morbus Crohn* zu einem AS-Austausch von Prolin zu Serin an Position 290 (Wong et al. 1995). Außerdem konnten bereits AS-Austausche von Leucin zu Prolin an Position 243, Prolin zu Threonin an Position 262 und ein alternatives Speißen des ASBT, verursacht durch eine 3 bp Substitution an der *Donor-Spleiß-Site* von Exon 3, festgestellt werden (Oelkers et al. 1997).

Im Gegensatz zur PBAM konnte bei der ideopathischen Gallensäuremalabsorption (IBAM, *Ideopathic Bile Acid Malabsorption*) meistens keine Mutation gefunden werden (Montagnani et al. 2001, 2006). Auch *Slc10a2*^{-/-} Knockout-Mäuse zeigten eine intestinale Gallensäuremalabsorption und eine gesteigerte fäkale Gallensäureausscheidung (Dawson et al. 2003). Eine dadurch gesteigerte Gallensäureneusynthese konnte den Verlust jedoch nicht ausgleichen und führte zu einer Erniedrigung des Gallensäurepools um ca. 80 %. In *Slc10a2*^(-/-) Knockout-Mäusen zeigte sich gegenüber den Wildtyp-Mäusen eine starke Verringerung des Tauro- β -muricholat Anteils zugunsten des Taurocholats (Dawson et al. 2003; Jung et al. 2007). Eine leicht erhöhte Ausscheidung von Fett, Fettsäuren und neutralen Sterolen konnte, bedingt durch eine erniedrigte Fett- und Cholesterinaufnahme im Darm, festgestellt werden. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Asbt den Metabolismus von Triglyzeriden verbessert und erhöhte Plasmaglukosespiegel in Mäusen normalisiert (Lundasen et al. 2012). Zusammen mit dem NTCP spielt ASBT eine wichtige Rolle in der Rückgewinnung von Gallensäuren durch die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs dieser Gallensäuren.

1.4.3 Pharmakologische Bedeutung des ASBT/Asbt

Wie in Kap. 1.4.2 erwähnt, führt eine Hemmung des Gallensäuretransporters ASBT durch Mutationen zu einer gesteigerten *de novo* Gallensäuresynthese in der Leber, denn durch einen Mangel an Gallensäuren wird die Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Expression (CYP7A1) hochreguliert (Dietschy et al. 1993a,b; Bjorkhem et al. 1997; Vhlacevic et al. 1999; Chiang et al. 2000). Dies hat die Senkung des hepatischen Cholesterinspiegels zur Folge. Somit sollten auch spezifische Inhibitoren des ASBT zu einer Senkung des Cholesterinspiegels führen. Verschiedene Klassen von ASBT-Inhibitoren, sog. *Bile Acid Reabsorption Inhibitors* (BARIs), wurden bisher entwickelt, die im Tiermodell den Plasmacholesterinspiegel senken können und eine durch lipidreiche Kost provozierte Arteriosklerose verhindern (Root et al. 1995; Higaki et al. 1998; Ichihashi et al. 1998; West et al. 2002; Li et al. 2004; Tremont et al. 2005; Kramer und Glombik 2006). BARIs wirken nicht systemisch, da sie nicht aus dem Darm absorbiert werden, und sind dadurch kaum toxisch. Dazu gehören die dimerischen Gallensäureanaloge, bei denen zwei Gallensäuren über einen Spacer miteinander gekoppelt werden (Kramer und Wess, 1996; Baringhaus et al. 1999), Benzothiazepin-Derivate (Hallén et al. 2002a; Lewis et al. 1995; Root et al. 1995; Root et al. 2002; Tollefson et al. 2003), Propanolamine, Barbiturate und Benzylamine (Kramer und Glombik 2006). Für die ASBT-Inhibitoren aus der Gruppe der Benzothiazepin-Derivate konnten sogar IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich festgestellt werden (Huang et al. 2005; Tremont et al. 2005; Bhat et al. 2003). *In vivo* Studien mit Asbt-Inhibitoren an Schweinen, Kaninchen und Hunden zeigten übereinstimmend eine gesteigerte fäkale Gallensäureexkretion, niedrigere Total- und LDL-Cholesterinspiegel, eine verstärkte Expression der hepatischen LDL-Rezeptoren und eine sekundäre Hochregulierung der hepatischen Cholesterin-7 α -Hydroxylase-Expression (Huff et al. 2002; West et al. 2002, 2003; Bhat et al. 2003; Telford et al. 2003; Li et al. 2004). Verschiedene Lignan- und Naphtolderivate konnten als Asbt-Inhibitoren identifiziert werden, darunter auch S-8921, welcher eine gemischte kompetitive und nicht-kompetitive Hemmung des Asbt mit IC₅₀-Werten von 2.5 μ M zeigte (Hara et al. 1997; Tollefson et al. 2000). *In vivo* Studien mit dieser Substanz an Hamstern, Ratten und Kaninchen ergaben eine Hochregulierung der Cholesterol-7 α -Hydroxylase- und der HMG-CoA-Reduktase- Aktivitäten und eine Steigerung der hepatischen LDL-Rezeptor-Expression sowie eine Reduzierung der Plasmacholesterinspiegel (Higaki et al. 1998; Ichihashi et al. 1998). Eine weitere Klasse von 4-oxo-1-phenyl-1,4-dihydroquinolin basierenden ASBT-Inhibitoren mit stark inhibitorischer Wirkung gegenüber dem ASBT mit IC₅₀-Werten um 1 μ M hat sich in Tierversuchen bewährt (Kurata et al. 2004). Viele dieser ASBT-Inhibitoren wurden für den klinischen Einsatz durch Substitution verschiedener funktioneller Gruppen weiterentwickelt und befinden sich derzeit in klinischer Prüfung (Kramer und Glombik 2006). Zudem kann die Funktion des ASBT, Substrate (Gallensäuren) aus dem Ileum aufzunehmen, ausgenutzt werden, um die orale

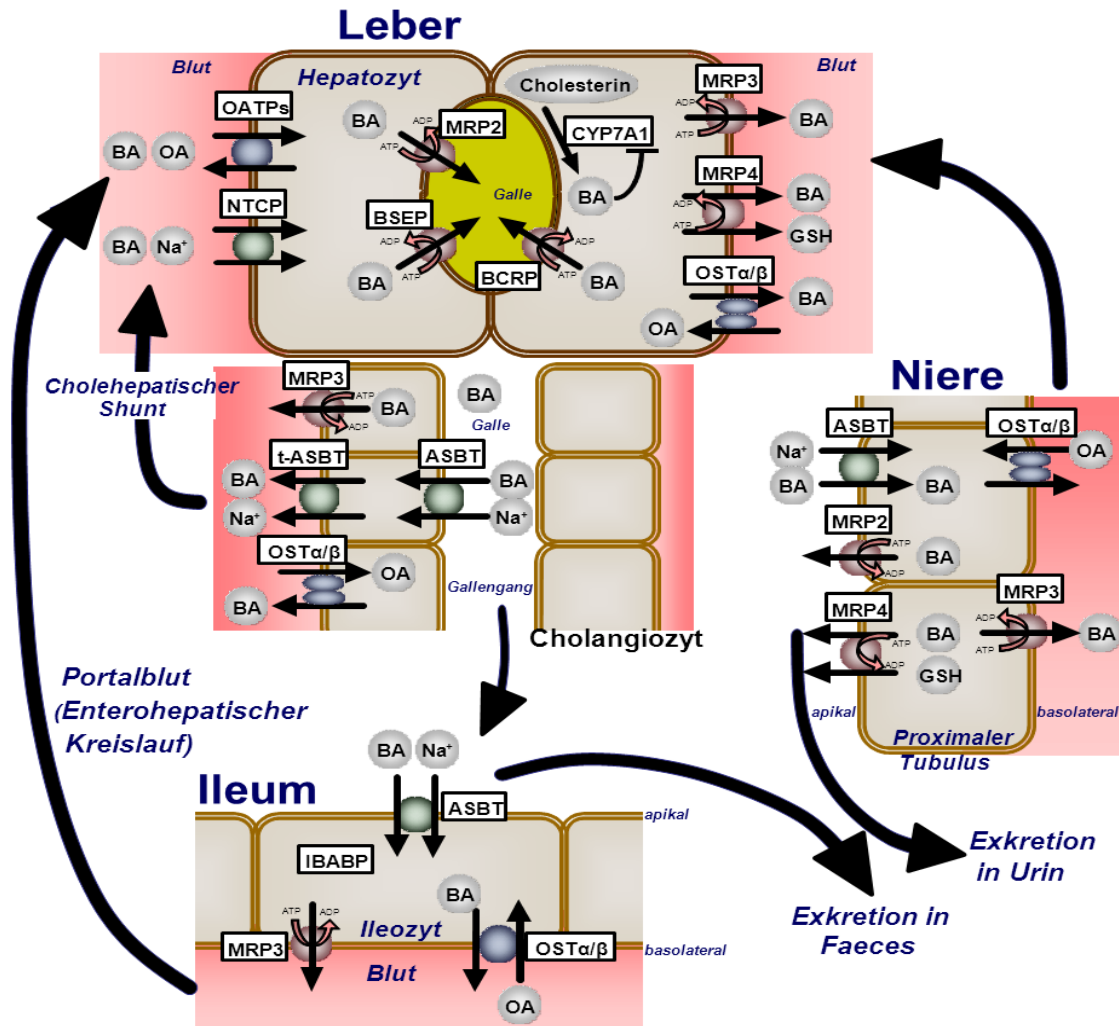
Bioverfügbarkeit von schlecht absorbierbaren Therapeutika zu verbessern (Balakrishnan und Polli 2006). So können Substanzen, die normalerweise schlecht im Ileum resorbiert werden, an Gallensäuren gekoppelt und über den ASBT aufgenommen werden. Dies wurde bereits teilweise erfolgreich für Peptide wie z.B. Renin-Inhibitoren, HIV-Proteaseinhibitoren und Acyclovir untersucht (Kagedahl et al. 1997; Kim et al. 1993; Kramer et al. 1994b, 1997b; Swaan et al. 1997a; Tolle-Sander et al. 2004).

1.5 Der enterohepatische Kreislauf

Hauptbestandteil von Gallenflüssigkeit ist Wasser, in dem verschiedene Substanzen wie z.B. Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^-), Gallensäuren, Phospholipide, Proteine und Cholesterin gelöst sind. In der Galle befinden sich auch verschiedene Ausscheidungsprodukte des Körpers, wie z.B. Hormone und Bilirubin, das die bräunlich-gelbe Farbe der Flüssigkeit ausmacht. Gallensäuren sind amphipathische steroidale Verbindungen, die mit Fett Mizellen bilden, und leiten sich aus dem enzymatischen Katabolismus von Cholesterin in der Leber ab (Meier und Stieger 2002). Innerhalb der Hepatozyten werden primäre Gallensäuren synthetisiert und an der terminalen Carboxylgruppe entweder mit den Aminosäuren Taurin oder Glycin konjugiert. Durch diese Konjugation wird der amphipatische Charakter erhöht und die Ionisationskonstante der Gallensäuren erniedrigt. Dadurch werden die Gallensäuren hydrophiler (Meier und Stieger 2002). Die Gallensäuren besitzen eine wichtige physiologische Rolle, indem sie Nahrungsfette und fettlösliche Vitamine emulgieren. Der enterohepatische Kreislauf von Gallensäuren startet dadurch, dass mehr als 95 % der ins Duodenum sezernierten Gallensäuren im Ileum durch den ASBT, welcher in der Bürstensaummembran der Enterozyten hoch exprimiert wird (Shneider et al. 1995), rückresorbiert werden und anschließend zum größten Teil über das Pfortaderblut wieder in die Leber gelangen (Abb. 1.3). So wird nur ein kleiner Teil der ca. 3–5 g Gallensäuren (0,2-0,5 g pro Tag beim Menschen) über den Stuhl eliminiert, der in entsprechender Größenordnung in der Leber aus Cholesterin nachgebildet wird. Nach erfolgter Aufnahme durch ASBT werden die Gallensäuren in den ilealen Enterozyten durch das zytoplasmatische IBABP zum basolateralen Pol der Enterozyten transportiert (Stengelin et al. 1996; Kramer et al. 1993, 1997a, 2001a,b). Verschiedene Efflux-Carrier wie z.B. MRP3, ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie, und die trunkierte Form des Asbt werden auf der basolateralen Membran des Enterozyten in Dünn- und Dickdarm exprimiert und sind am basolateralen Efflux von Gallensäuren aus den Enterozyten beteiligt (Akita et al. 2002; Lazaridis et al. 2000; Kip et al. 2004). Auch der heterodimere „Organic Solute Transporter α - β “ (*Osta/Ost β*), welcher in der basolateralen Membran ilealer Enterozyten der Maus nachgewiesen wurde, ist am Efflux der

Gallensäuren beteiligt. Durch Koexpression von Ost α /Ost β mit dem ASBT in polarisierten MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney) konnte ein transzellulärer Transport von apikal nach basolateral nachgewiesen werden (Dawson et al. 2005). Die Gallensäuren gelangen nach der intestinalen Reabsorption mit dem Portalblut in die Sinusoide der Leber und werden dort durch den NTCP in der basolateralen Domäne des Hepatozyten effizient aus dem Portalblut extrahiert und in die Hepatozyten aufgenommen (Stieger et al. 1994; Meier und Stieger 2002). Nicht nur NTCP, sondern auch verschiedene Mitglieder der *Organic Anion Transporting Polypeptide* wie z.B. Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 bei der Ratte, sowie OATP1A2, OATP1B1 und OATP1B3 beim Menschen sind an der hepatischen Gallensäurereabsorption beteiligt, die Natrium-unabhängige Transporteigenschaften v.a. für unkonjugierte Gallensäuren, aber auch konjugierte Gallensäuren, Hormone, Prostaglandine, konjugierte Steroide und Xenobiotika aufweisen (Hagenbuch und Dawson 2004; Hagenbuch und Meier 2003, 2004; Kullak-Ublick et al. 2004; Meier und Stieger 2002; Trauner und Boyer 2003). Als Schutz vor einer Cholestase werden v.a. MRP3 und Ost α /Ost β an der basolateralen Membranseite des Hepatozyten exprimiert und schützen diesen vor zu hohen Gallensäurekonzentrationen. Dies führt zu einer renalen erhöhten Ausscheidung der Gallensäuren (Borst und Elferink 2002; Meier und Stieger 2002; Trauner und Boyer 2003; Boyer et al. 2006; Zollner und Trauner 2006; Geier et al. 2007; Hofmann 2007).

Die Ausscheidung der Gallensäuren in die Galle erfolgt v.a. durch den in der kanalikulären Membran der Hepatozyten exprimierten BSEP, der vorwiegend Taurin- und Glycin-konjugierte Gallensäuren und das unkonjugierte Chenodeoxycholat und Deoxycholat transportiert (Byrne et al. 2002; Noe et al. 2002) sowie durch den MRP2, der vorwiegend sekundär glukuronidierte und sulfatierte Gallensäuren aufnimmt (Akita et al. 2001). Auch BCRP wird an der kanalikulären Membran der Hepatozyten exprimiert und ist in der Lage, sulfatierte Gallensäuren zu transportieren (Pauli-Magnus et al. 2005; Robey et al. 2009; Suzuki et al. 2003a). Neben seiner Expression im Dünndarm wurde die Expression des ASBT in der apikalen, die trunkierte Form (t-ASBT) in der basolateralen Membran der Cholangiozyten in der Leber nachgewiesen (Lazaridis et al. 2000). Beide Carrier bilden hier wahrscheinlich einen sog. cholehepatischen Shunt, in welchem konjugierte Gallensäuren zwischen Galle und Leber zirkulieren können. Da dieser Shunt keinen signifikanten Einfluss auf die Gallensäurekonzentration in der Galle hat, wird angenommen, dass durch diesen Weg die sekretorische Funktion und die proliferative Kapazität der Cholangiozyten reguliert wird (Alpini et al. 1997, 1999, 2005; Lazaridis et al. 1997, 2000; Chignard et al. 2001, 2003). Zusätzlich wird ASBT in der apikalen Membran der proximalen Tubuli der Niere exprimiert und rückresorbiert dort konjugierte Gallensäuren (Christie et al. 1996; Trauner und Boyer 2003; Kullak-Ublick et al. 2004). NTCP und ASBT tragen somit als effiziente Gallensäuretransporter maßgeblich zur Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs



Die Abbildung zeigt die Transportsysteme, die am enterohepatischen Kreislauf beteiligt sind. Gallensäuren werden in der Leber im Hepatozyten durch NTCP und OATPs wie z. B. OATP1A2, OATP1B1 und OATP1B3 aufgenommen. Der hepatische Efflux in die Galle erfolgt durch die Efflux-Carrier BSEP, MRP2 und BCRP. MRP3, MRP4 und Osta/Ostβ werden an der basolateralen Membranseite des Hepatozyten exprimiert und schützen diesen vor zu hohen Gallensäurekonzentrationen (z.B. bei Cholestase). Dies führt zu einer erhöhten renalen Ausscheidung der Gallensäuren. Die Reabsorption der Gallensäuren erfolgt im proximalen Tubulus der Niere aktiv durch ASBT, ein Efflux in die systemische Zirkulation zurück zur Leber über Osta/Ostβ und MRP3. Die Cholangiozyten des Gallengangs exprimieren ASBT auf der apikalen, t-ASBT und MRP3 auf der basolateralen Membranseite und können so einen cholehepatischen Kreislauf bilden. Im Darm findet die Aufnahme der Gallensäuren durch ASBT statt. Der intrazelluläre Transport erfolgt an IBABP gebunden. Der Efflux erfolgt durch MRP3 und Osta/Ostβ auf der basolateralen Membranseite (nach Döring et al. 2012). (OA Organische Anionen, BA Gallensäuren, GSH Glutathion).

1.6 Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT, SLC10A6)

Im Jahr 2004 wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Gießen ein neuer Transporter kloniert, der der SLC10-Familie zugeordnet und als „Sodium-dependent Organic Anion Transporter“ (SOAT/SLC10A6) bezeichnet wurde (Geyer et al. 2004). SOAT/Soat von Mensch, Ratte und Maus besteht aus 370-377 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 40,3 bis 41,2 kDa. Die höchste phylogenetische Verwandtschaft ist mit 42 % Sequenzidentität zum ASBT vorhanden, mit welchem er eine Subfamilie bildet (Geyer et al. 2004, 2006); zum NTCP beträgt sie 33 %. Die deutlichsten Unterschiede sind dabei im C- und N-Terminus zu finden, die TMD zeigen dagegen eine relativ homologe Struktur (Geyer et al. 2007). Für SOAT wurde nachgewiesen, dass der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus des Proteins intrazellulär lokalisiert ist (Geyer et al. 2007), so dass eine ungerade Anzahl an TMD angenommen werden kann. Eine Kolo-kalisation von SOAT und NTCP mit Heterodimerbildung konnte *in vitro* festgestellt werden (Bijsmans et al. 2012).

1.6.1 Substratspektrum und Transporteigenschaften des SOAT

Im Gegensatz zu NTCP und ASBT zeigte SOAT keinen Transport der Gallensäuren Taurocholat, Cholat, Lithocholat, Deoxycholat und Chenodeoxycholat; auch unkonjugierte Steroide wie DHEA, Estron, Estron-3 β -D-glucuronid und sulfatierte Schilddrüsenhormone wurden nicht aufgenommen (Geyer et al. 2007; Visser et al. 2010). Eine Na⁺-abhängige Aufnahme der sulfatierten Steroidhormone DHEAS, E₁S und PREGS, welche als hormonell inaktive Steroidkonjugate im Plasma zirkulieren, konnte in mit SOAT stabil transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Auch für die Xenobiotika 2-SMP und 4-SMP und die sulfatierte Gallensäure Tauroolithocholat-3-sulfat (TLCS) wurde ein Transport durch SOAT festgestellt. Durch Inhibitionsstudien wurde eine starke Interaktion des SOAT-Transports mit Substanzen, die eine negativ geladenen Sulfatgruppe und mindestens zwei Hydrocarbonringen aufweisen, gezeigt. TLCS, Glycolithocholat-3-sulfat, Lithocholat-3-sulfat, 1omega-SEP, BSP und 2- und 4-SMP hemmten den SOAT-Transport fast vollständig. Bei einem niedrigeren pH-Wert (<7,4) weist SOAT eine höhere Transportrate auf als bei erhöhtem pH-Wert (pH \geq 7,4). Der equimolare Austausch von Na⁺ gegen Li⁺ bzw. K⁺ zeigte noch eine 36 bzw. 19 %ige SOAT-Aufnahme des Substrats DHEAS (Döring, Dissertation 2010), der Austausch durch Cholinchlorid führte dagegen zum Funktionsverlust.

1.6.2 Gewebeexpression und mögliche Funktion

Der Soat der Ratte zeigte eine relativ breite Expression mit höchster Expression in Herz, Lunge, Skelettmuskel, Milz, Hoden, Nebenniere und Dünndarm und schwächeren Expressi-

onsraten in Gehirn, Niere und Colon (Geyer et al. 2004). Beim Mensch konnte die höchste SOAT-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR im Hoden festgestellt werden. Außerdem zeigte sich eine relativ hohe Expression in der humanen Plazenta, dem Pankreas und der Brustdrüse, aber nur eine sehr geringe in Gehirn, Colon, Niere, Leber, Ovar, Prostata, Dünndarm, Milz und Thymus (Geyer et al. 2007). Bei einer Untersuchung von Mammatumorproben konnte zwar keine Korrelation zwischen SOAT-Expression, Sulfatase (StS)-Expression und Estrogenrezeptorstatus nachgewiesen werden, bei einzelnen Tumormproben zeigte sich jedoch eine erhöhte oder erniedrigte Expression (Funk, Dissertation 2009). Zusätzlich konnte in einer mit SOAT transfizierten hormonsensitiven Brustkrebszelllinie (T47D) eine 10-fach höhere Sensitivität für E₁S im Proliferationsassay gegenüber den mit Leervektor transfizierten T47D-Kontrollzellen gezeigt werden; ein Effekt, der durch den selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen, den Steroidsulfatase-Inhibitor STX64 und den SOAT-Inhibitoren 2- und 4-SMP aufgehoben wurde (Karakus, Dissertation 2009). Eine Rolle des SOAT bei der Entstehung hormonabhängiger Mammakarzinome ist deshalb nicht auszuschließen. SOAT könnte ein neues *Drug Target* in der Therapie hormonabhängiger Tumoren darstellen, denn durch die Koexpression mit StS, die auch in gesundem Brustgewebe festgestellt wurde (Funk, Dissertation 2009), ist eine funktionelle Zusammenarbeit beider Proteine möglich. Durch die katalytische Aktivität der StS können sulfatierte Steroidhormone in aktive Steroide mit einer proliferativen Wirkung auf das Tumorgewebe überführt werden (Suzuki et al. 2005).

1.6.3 Steroidsulfate und deren enzymatische Umwandlung

SOAT transportiert Na⁺-abhängig die sulfatierten Steroidhormone DHEAS, E₁S und PREGS. Steroidsulfate sind bei physiologischem pH-Wert negativ geladen und können dadurch nicht wie unkonjugierte Hormone passiv per physikalischer Diffusion die Zellmembran durchdringen, sondern sind auf einen Transporter angewiesen. Einige Steroidsulfattransporter sind bereits bekannt wie z.B. die OATPs (Organic anion-transporting polypeptide) und die OATs (Organic anion transporter) (Pizzagalli et al. 2003). Nach Aufnahme in die Zelle kann die Steroidsulfatase (StS, Arylsulfatase C), die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, die Sulfatgruppe an Position 3 der Steroidsulfate abspalten. So überführt sie sulfatierte Steroide innerhalb der Zelle in ihre aktive Form und spielt bei der Regulation der biologisch aktiven Steroide eine entscheidende Rolle (Reed et al. 2005). Bei Mangel an StS kommt es zum Krankheitsbild der X-chromosomal-rezessiven Ichthyose durch vermehrte Cholesterinsulfateinlagerung im Stratum Corneum der Haut (Hernández-Martin et al. 1999). Ein Anstieg der Sulfatasegenexpression und der Sulfataseaktivität kann dagegen zur Entstehung bzw. Proliferation von Brusttumoren führen (Utsumi et al. 2000; Al et al. 2006). Die Sulfotransferase hingegen führt zu einer Sulfokonjugation von Steroiden, wodurch diese inaktiv werden.

Folgende Enzyme sind an einer weiteren Umwandlung von z.B. DHEAS beteiligt. Nachdem DHEAS durch die StS desulfatiert wurde, kann die 3 β -HSD (3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) DHEA (Dehydroepiandrosteron) zu Androstendion umwandeln. Durch die Aromatase (CYP19A1) können Androgene weiter zu Estrogenen umgewandelt werden; Testosteron kann so zu Estradiol (E₂) und Androstendion zu Estron (E₁) aromatisiert werden (Suzuki et al. 2005). Die 17 β -HSD (17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase), 14 Isoformen konnten bisher kloniert werden, katalysiert sowohl Reduktions- (E₁ \rightarrow E₂, DHEA \rightarrow Androstendiol, Androstendion \rightarrow Testosteron) als auch Oxidationsreaktionen (E₂ \rightarrow E₁ etc.) von Estrogenen und Androgenen an Position 17 des Sterangerüsts (Meier et al. 2009).

1.7 Weitere Mitglieder der SLC10-Familie

1.7.1 SLC10A3

Das SLC10A3-Gen, welches aus einem kodierenden Exon besteht, wurde im Jahr 1988 aus der humanen Plazenta isoliert. Das Protein besteht aus 477 Aminosäuren und zeigt mit 33,9 % die höchste Aminosäuresequenzidentität zum SLC10A5, aber nur eine ca. 20 %ige zum NTCP und ASBT, weshalb es nachträglich in diese Familie eingegliedert wurde (Hagenbuch und Dawson 2004). Die physiologische Rolle von SLC10A3 ist nicht geklärt, aber die Expression in der Plazenta, T-Lymphozyten, Neuroblastomzellen, Chorionkarzinomzellen u.v.m. wurde festgestellt (Alcalay und Toniolo 1988). Eine physiologisch relevante Rolle in der humanen Plazenta kann jedoch angenommen werden; im Vergleich zu 108 weiteren getesteten Mitgliedern der SLC-Familie zeigte SLC10A3 mit die höchsten Expressionen überhaupt in der Plazenta (Nishimura und Naito 2005).

1.7.2 SLC10A4

SLC10A4, dessen Protein aus 437 Aminosäuren besteht, bildet mit NTCP eine Subfamilie (Geyer et al. 2006) und zeigt entsprechende Aminosäuresequenzidentitäten von 29,7 %, 29,1 % bzw. 28,7 % zu NTCP, ASBT und SOAT. Eine Heterodimerbildung von SLC10A4 mit NTCP konnte in U2OS-Zellen *in vitro* gezeigt werden (Bijsmans et al. 2012). Die höchste Expression von SLC10A4/Slc10a4 wurde, ungewöhnlich für die SLC10-Familie, im Gehirn verschiedener Spezies nachgewiesen (Geyer et al. 2008). Bei der Ratte wurde Slc10a4 in synaptischen Vesikeln cholinergischer Neurone des zentralen Nervensystems und Darmnervensystems (Geyer et al. 2008) und monoaminergischer Neurone des zentralen und peripheren Nervensystems, sowie im Epithel von Lunge und Harnblase lokalisiert (Burger et al. 2011). In *Slc10a4-Knockout*-Mäusen wurde eine selektive cholinerge Hypersensitivität bemerkt (Zelano et al. 2012). Die Funktion von Slc10a4 ist jedoch weiterhin ungeklärt. Taurocholat

(TC), E₁S, DHEAS, PREGS und Cholinchlorid werden nicht vom Slc10a4 transportiert (Geyer et al. 2008).

1.7.3 SLC10A5

Das SLC10A5-Gen besteht, wie SLC10A3, aus einem kodierenden Exon mit einem Protein aus 438 AS. Die höchste AS-Sequenzidentität zeigt sich mit 34 % zum SLC10A3, zum NTCP, ASBT und SOAT ist sie mit ca. 22 % verhältnismäßig gering (Döring et al. 2012). 2007 wurde das Transkript aus der Leber von Mensch und Maus sowie aus dem Dünndarm der Ratte kloniert. In Leber und Niere von Mensch, Maus und Ratte sowie im Dünndarm der Ratte wurde die höchste Expression von SLC10A5/Slc10a5 festgestellt (Fernandes et al. 2007); es konnte aber keine Transportaktivität für Gallensäuren wie Taurocholat und Cholat und die sulfatierten Steroidhormone E₁S oder DHEAS gezeigt werden. Allerdings deutet das Expressionsmuster in Hepatozyten und im proximalen Tubulus der Niere auf einen möglichen hepatischen und renalen Transport von noch nicht identifizierten Substraten hin (Fernandes et al. 2007).

1.7.4 SLC10A7

SLC10A7/Slc10a7 zeigt bei Mensch, Ratte, Maus und Frosch eine sehr breite Gewebeexpression (Godoy et al. 2007). Zu zahlreichen bakteriellen Proteinen (*SLC10A7-related proteins*) zeigt sich eine hohe phylogenetische Verwandtschaft mit >20 %; zu den Mitgliedern der SLC10 Familie zeigt sich jedoch nur eine Sequenzidentität von 12 – 16 %, weshalb die Zuordnung umstritten ist. Das SLC10A7-Gen ist mit 12 kodierenden Exonen und mehr als 10 Transkriptionsvarianten das komplexeste Gen der SLC10-Familie (Döring et al. 2012). Auch für dieses Protein konnte kein Transport von Gallensäuren oder sulfatierten Steroidhormonen festgestellt werden (Godoy et al. 2007). Eine Deletion im *RCH1*-Gen, welches ein homologes Gen des humanen SLC10A7 darstellt, erzeugt eine Hypersensitivität gegenüber hohen extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen und eine Toleranz von Azolen und Li⁺ in *Candida albicans*-Hefepilzkulturen (Jiang et al. 2012). Deshalb wird eine Rolle des *RCH1*-Gens in der Regulation der Ca²⁺-Homöostase angenommen. Ob der Ca²⁺-Homöostase bei Vertebraten durch das SLC10A7-Homolog eine Rolle zukommt, ist unklar.

1.8 Zielsetzung

Die physiologische Rolle des humanen SOAT (SLC10A6), welcher sulfatierte Steroidhormone wie DHEAS, E₁S und PREGS transportiert und im Hoden stark exprimiert wird, ist derzeit noch unklar. Zur Aufklärung ist daher die Generierung einer Knockout-Maus angedacht. Ein Ziel der Arbeit war deshalb, den Soat der Maus (mSoat) funktionell und molekularbiologisch zu charakterisieren, um eine Übertragbarkeit der erhaltenen Ergebnisse auf den Mensch zu überprüfen. Die Ergebnisse der qRT-PCR, der immunhistochemischen Untersuchungen und der Transporteigenschaften wurden mit den bereits vorliegenden Ergebnissen des SOAT verglichen.

Zusätzlich sollte durch eine RACE-PCR die Soat-Sequenz vom Schwein (susSoat) bestimmt und die Aminosäuresequenzidentität mit anderen Spezies verglichen werden. Um die physiologische Rolle des SOAT im Hoden näher zu bestimmen, wurde die susSoat-Expression im Hoden zu verschiedenen Altersstufen, prä- und postpubertär, festgestellt.

Zwei weitere wichtige Mitglieder der SLC10-Familie, zu der auch SOAT zählt, weisen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren zwischen Leber und Dünndarm auf, der ASBT und der NTCP. Trotz der hohen phylogenetischen Verwandtschaft zum SOAT zeigen sich deutliche Unterschiede in der Substratspezifität. Daher wurde das Substratspektrum aller drei Transporter untersucht, um ligandenbasiert Unterschiede und Gemeinsamkeiten der funktionellen Gruppen zu bestimmen, die mit den jeweiligen Bindungsstellen interagieren.

Auf der Suche nach einem potenten Inhibitor sollte außerdem ein 3D-QSAR SOAT-Pharmakophormodell generiert werden. Dafür wurden ca. 100 Substanzen auf ihre Inhibition der DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293-Zellen überprüft. Die erhaltene SOAT-Pharmakophore wurde mit den bereits existierenden Pharmakophormodellen des ASBT und des NTCP verglichen.

2 MATERIAL

Das Auffüllen der Ansätze, Puffer und Medien auf das entsprechende Volumen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O).

2.1 Materialien für die Molekularbiologie

2.1.1 Primer

Die verwendeten Primer zum Nachweis der Expression von humanem sowie murinem SOAT wurden mit dem Programm Oligo 4.0 ausgewählt

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m
Maus:		
mSoatfor	GTC CTT CTC TGC TGA GTA CC	60
mSoatrev	TCT CTC TGG GCT GCT TCT C	59
mArfor	CAT GCA ACT TCT TCA GCA GCA GC	65
mArrev	TAC CTG CTT CAC TGC TGC CAG AG	66
mHprt1for	GTT GTT GGA TAT GCC CTT GAC	59
mHprt1rev	CAC CTG CTA ATT TTA CTG GCA AC	61
Schwein:		
susSoat1GSPF	CTT GGA GTT CAG ACG GCG TTC	61,8
susSoat1GSPR	GCA GCC TCT TCA TTC ACC TCT	59,8
susNGSPFSoat	CGG CAT CTG TGT GAA TTA CAA GTG GC	64,8
susNGSPRSoat	GAA CGC CGT CTG AAC TCC AAG ATC C	66,3
S-GSPRSoat	GAT GAA GCT GAT GGT CAG AAG AAC	63,0
S-GSPFSoat	TTG CTG TTC TCA TCA TGG GCT GCT G	64,6

Die Synthese der Primer wurde von der Firma *MWG-Biotech* (Ebersberg) und *Metabion* (Martinsried) durchgeführt.

2.1.2 Enzyme

Hitzebeständige DNA-Polymerasen

AmpliTaQ Gold DNA Polymerase*

Applied Biosystems, Darmstadt

→ Abspaltung einer angefügten chemischen Gruppe
bei optimaler Anlagerungstemperatur (*Hot Start*)

→ keine 3'→5' Exonuklease Aktivität

*Nichtbenutzung von TM oder ® bedeutet nicht, dass die Produktbezeichnungen frei verfügbar sind.

Expand High Fidelity PCR System → Mix aus thermostabiler <i>Taq</i> DNA Polymerase und thermostabiler <i>Tgo</i> DNA Polymerase mit 3'→5' Exonuklease Aktivität (<i>proofreading</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Phusion High Fidelity DNA Polymerase</i> → Pyrokoccus-ähnliches Enzym, <i>lacI</i> -basierte Methode → mit 3'→5' Exonuklease Aktivität (<i>proofreading</i>)	Finnzymes, Keilaranta, Espoo, Finnland
Thermoprime Plus DNA Polymerase → <i>Taq</i> DNA Polymerase	ABgene, Hamburg

Reverse Transkriptase

SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
---	-----------------------

Ligasen

T4-RNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
---------------	-----------------------

Sonstige Enzyme

CIP (<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I, RNase-frei (10U/μl)	Applied Biosystems, Darmstadt
DNase I, RNase-frei (1U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
EcoRI (10U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
TAP (<i>Tobacco Acid Pyrophosphatase</i>)	Invitrogen, Karlsruhe

Sonstiges Material

dNTPs (je 10 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Vektoren

Der pCR4-TOPO-Vektor wurde zur Sequenzierung bei der RACE-PCR verwendet. Folgende Zelllinien lagen bereits stabil transfiziert vor: mSoat-HEK293-Zellen wurden mit dem pcDNA9- Vektor, die SOAT-, NTCP-, und ASBT-HEK293-Zellen mit dem pcDNA5/FRT/TO- Vektor stabil transfiziert.

pCR4-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

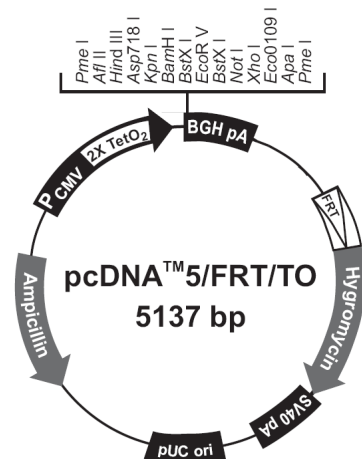
3956 bp Gesamtlänge
CMV-Promotor, *lac* promotor Region,
M13 Reverse priming site, M13 Forward priming site,
T3/T7 Priming site; Ampicillin resistance gene,
Kanamycin resistance gene
MCS: *SpeI*, *PstI*, *PmeI*, *EcoRI*, *NotI*



pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen, Karlsruhe)

5137 bp Gesamtlänge

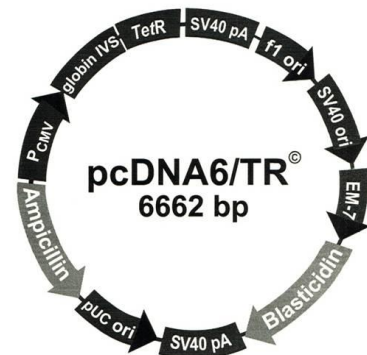
CMV-Promotor mit TATA-Box und 2 x Tetracyclin-Operon (TetO₂), BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Ampicillin resistance gene, Hygromycin resistance gene, MCS: *Pme*I, *Afl*II, *Hind*III, *Asp*718I, *Kpn*I, *Bam*HI, *Bst*XI, *Eco*RV, *Bst*XI, *Not*I, *Xho*I, *Eco*0109I, *Apa*I, *Pme*I



pcDNA6/TR (Invitrogen, Karlsruhe)

6662 bp Gesamtlänge

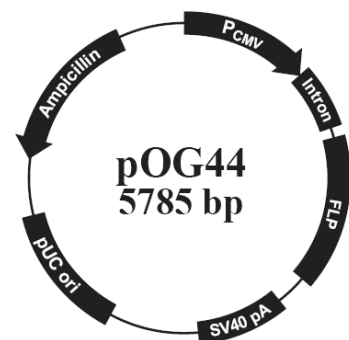
CMV-Promotor, SV40 early Promotor, EM-7 Promotor, *bla* Promotor, *Tet*R gene, Ampicillin resistance gene, Blasticidin resistance gene



pOG44 (Invitrogen, Karlsruhe)

5785 bp Gesamtlänge

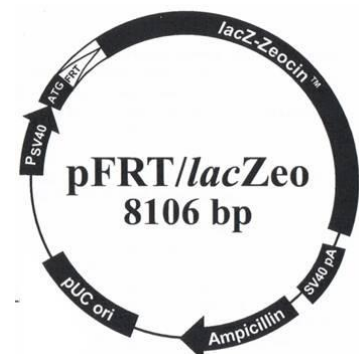
CMV-Promotor, synthetisches Intron, Leserahmen Flp Recombinase (FLP), SV40 PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Amp^r



pFRT/lacZeo (Invitrogen, Karlsruhe)

8106 bp Gesamtlänge

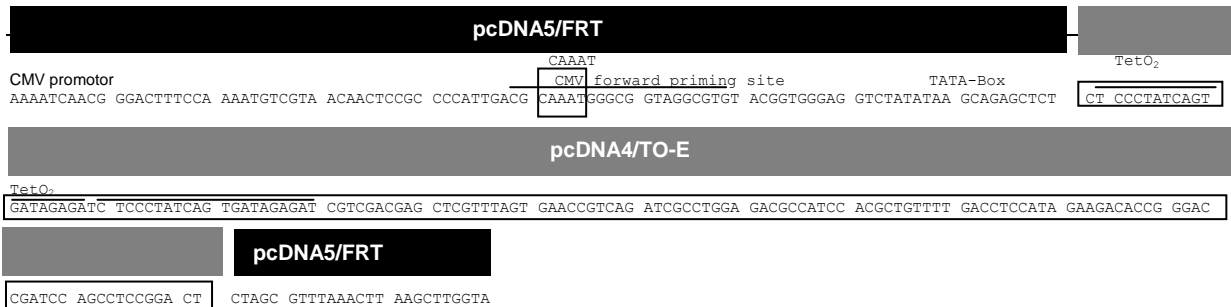
SV40 early Promotor, FRT site, LacZ-Zeocin fusion gene, Zeocin resistance gene, *bla* promoter, Ampicillin Resistenzgen



pcDNA9 (basierend auf pcDNA5/FRT und pcDNA4/TO)

Der Vektor pcDNA5/FRT (schwarz) wurde mit dem Tetracyclin-Operon von pcDNA4/TO (grau) zusammengefügt und von Dr. B. Ugele (München) zur Verfügung gestellt.

5,07 kb Gesamtlänge, CMV-Promotor, 2x Tetracyclin-Operon (TetO₂), BGH Poly A, FRT Site, Hyg^r, Amp^r, pUC origin, *bla*-Promotor, MCS (*Nhe*I, *Pme*I, *Afl*II, *Hind*III, *Asp*718I, *Kpn*I, *Bam*HI, *Bst*XI, *Not*I, *Xho*I, *Apa*I, *Pme*I).

**2.1.4 Bakterienstämme****One Shot TOP10 Chemically Competent E.coli (Invitrogen, Karlsruhe)**

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*araIeu*)7697 *galJ* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

2.1.5 qPCR**TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Darmstadt)**

Die nachfolgenden Assays wurden für Mensch und Maus aus den kommerziell erhältlichen, bereits vorgefertigten Assays von Applied Biosystems ausgewählt. Folgende Präfixbedeutung wird von Applied Biosystems verwendet: Hs für Homo sapiens, Mm für mus musculus. Die Endung _m bedeutet, dass die Sonde auf der Exongrenze von zwei benachbarten Exonen liegt, dieser Assay somit keine genomische DNA detektieren kann und kein DNase Verdau notwendig ist. Die Endung _s (und auch _g) impliziert, dass Primer und Sonde innerhalb eines Exons liegen und genomische DNA detektieren können, ein DNase Verdau ist demnach Pflicht.

TaqMan Gene Expression Assays:

SOAT human	Hs01399354_m1	(Exongrenze 5-6)
ASBT human	Hs00166561_m1	(Exongrenze 4-5)
NTCP human	Hs00161820_m1	(Exongrenze 1-2)
ACTB human	Hs99999903_m1	(Exongrenze 1-2)
mSoat	Mm00512730_m1	(Exongrenze 5-6)
mB2m	Mm00437762_m1	(Exongrenze 1-2)
mHprt1	Mm00446968_m1	(Exongrenze 6-7)

Die speziell angefertigten Primer und Sonden des Schweins waren nicht vorgefertigt erhältlich und wurden mit Hilfe des Programms *Primer Express® Software for Real-Time PCR Version 3.0* (Applied Biosystems, Darmstadt) ausgesucht.

susSoat	Sequenz (5' → 3')
Sonde	TTG CCG CGT ATA AAA
susSoatGSPF	GCT GCT GGA TGG ATT TCT CAT T
susSoatGSPR	TTT GTT CTT CAG GCT CCT CTT GTA C
susHpvt1	
Sonde	CCT ATA GAC TAT CGG TTC CCT
susHpvt1GSPF	GCA TTC CTG AAC TCT TTA TTT GCA
susHpvt1GSPR	TTC ACG AGT CAA ACA ACA ATC CA
susTbp	
Sonde	CGG CCC TGT GTG GTG
susTbpGSPF	TGG TAC ATT TAA TGG TGG TGT TGT G
susTbpGSPR	CCT AAA CCG AAC GTC CAT CCT

Komponenten: zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation
FAM-markierte TaqMan MGB (Minor Groove Binder) Sonde

TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Darmstadt)

Komponenten: AmpliTaq Gold DNA Polymerase
dNTPs mit dUTP
Referenzfarbstoff ROX
optimierte Pufferkomponenten

2.1.6 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Penzberg
GeneRacer Kit	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
Oligotex mRNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden
peqGOLD RNAPure™	peqLab, Erlangen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN RNeasy FFPE Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNAlater®	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Micro Kit, FFPE Tissue kit	Ambion, Carlsbad, USA
RNase AWAY Reagent	Ambion, Carlsbad, USA
RNaseZap Wipes	Ambion, Carlsbad, USA
Sephadex G50 Quick Spin Columns for RNA purification	Roche Diagnostics, Mannheim
S.N.A.P. Columns	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
Tri Reagent™ (RNA-Isolierung)	Sigma, Taufkirchen

2.1.7 Puffer und Medien

LB-Medium (1 l)	Trypton	10 g
	NaCl	10 g
	Yeast-Extract	5 g
	→ pH 7,0 (NaOH), autoklavieren	
	→ vor Gebrauch Selektionsantibiotikum hinzufügen	
LB-Agar (1 l)	LB-Medium	1 l
	+ Agar-Agar	20 g
	→ autoklavieren und abkühlen auf 60°C	
	→ Selektionsantibiotikum zufügen und Platten gießen	
SOC Medium (Invitrogen, Karlsruhe)	Trypton	2 %
	Yeast-Extract	0,5 %
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM

2.2 Agarose-Gelelektrophoresen

2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese (DNA)

6 x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM	
	Bromphenolblau	0,03 %	
	Xylen Cyanol FF	0,03 %	
	Glycerin	60 %	
	EDTA	60 mM	
10 x TAE-Puffer (1 l)	Tris, in 500ml H ₂ O vorlösen	40 mM	48,4 g
	Essigsäure		11,4 ml
	0,25 M EDTA, pH 8,0	10 mM	40 ml
	→ auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen		
	→ als 1 x verwenden		
EB-Färbelösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	1 µg/µl	
GelRED- Färbelösung (Biotium, Hayward, USA)	GelRED		300 µl
	1 M NaCl		100 ml
	ddH ₂ O		900 ml
1 % Agarosegel	Agarose		1 g
	1 x TAE Puffer		100 ml

2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA)

DEPC-ddH₂O (1 l)	DEPC [1 mg/ml] ddH ₂ O → über Nacht inkubieren → autoklavieren	0,1 %	1 ml 1 l
10 x MOPS-Puffer (400 ml)	MOPS Natriumacetat 20 mM EDTA DEPC-ddH ₂ O → pH 7,0 (NaOH) → lichtgeschützt lagern → als 1 x verwenden	200 mM 100 mM 1 mM	16,74 g 3,28 g 20 ml 380 ml
Agarosegel	Agarose DEPC-ddH ₂ O 10 x MOPS → kochen bis Agarose gelöst ist Formaldehyd → zugeben und Gel gießen		1 g 40 ml 5 ml 7 ml
1,3 x Ladepuffer Roti-Load RNA (Roth, Karlsruhe)	Formamid MOPS Natriumacetat EDTA Formaldehyd Bromphenolblau Ethidiumbromid → pH 7,0	55 % 22 mM 8,8 mM 1 mM 6,8 % 0,03 % 0,005 %	

2.2.3 Längenstandards

Agarose-Gelelektrophorese		
Gene Ruler DNA Ladder Mix	100, 200, 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900, 1031 , 1200, 1500, 2000, 2500, 3000 , 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
peqGOLD High Range RNA-Leiter	200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 bp	PeqLab, Erlangen
Gene Ruler Low Range DNA Ladder Mix	25, 50, 75, 100 , 150, 200, 300 , 400, 500, 700	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zelllinien

Flp-In T-REx HEK293-Zellen (= FlpIn-HEK293-Zellen) (Invitrogen, Karlsruhe)

Wirtszelllinie:	<i>human embryonic kidney cells</i> 293 (HEK293) ATTC-Nummer CRL-1573
Modifikation:	stabile Integration einer <i>FRT site</i> in das Genom (pFRT/ <i>lacZeo</i>) konstitutive Expression eines Tet-Repressors (pcDNA6/TR)
Charakteristika:	adhärent wachsend Zeocin-resistent → Selektion auf integrierte <i>FRT site</i> Blasticidin-resistent → Selektion auf pcDNA6/TR (Tet-Repressor)

Die Zeocin- und Blasticidin-resistente Flp-In T-REx 293-Zelllinie lag bereits fertig kloniert vor; sie entstand durch die stabile Transfektion von pFRT/*lacZeo* in die HEK293-Wirtszelllinie, in die zusätzlich der pcDNA6/TR-Vektor stabil transfiziert wurde.

2.3.2 Zellkulturmedien

HEK293-Medium (500 ml)	D-MEM (high glucose)		217,5 ml
	F-12 (Ham)		217,5 ml
	FKS	10 %	50 ml
	L-Glutamin [200 mM]	4 mM	10 ml
	Pen/Strep [10000 Units/ml; 10000 µg/ml]	1 %	5 ml
HEPES-Puffer (1 l)	HEPES	18 mM	4,77 g
	NaCl	120 mM	7,07 g
	KCl	5 mM	0,4 g
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,06 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 mM	0,08 g
	Glucose	6 mM	1 g
	Phenolrot	0,03 mM	0,01 g
	EDTA	1 mM	0,37 g
	→ pH 7,4 (HCl/NaOH)		
Trypsinlösung (100 ml)	Trypsin	0,025 %	25 mg
	HEPES-Puffer		100 ml
Einfriermedium	Normalmedium	90 %	
	DMSO	10 %	
Beschichtungsmedium	Poly-D-Lysin	100 µg/ml	
Trypanblau (100 ml)	Trypanblau	4 %	4 g
	NaCl	0,9 %	0,9 g

2.3.3 Antibiotika

Antibiotika	Verwendungszweck	Endkonzentration	Hersteller
Blasticidin S Hydrochlorid	Selektion auf pcDNA6/TR	15 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B [50 mg/ml]	Selektion auf Insert	150 µg/ml	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin Hydrochlorid	Induktion der Proteinexpression	10 µg/ml	Sigma, Taufkirchen

2.4 Transportmessungen an eukaryotischen Zellen

2.4.1 Puffer und Lösungen

Transportpuffer mit Na⁺ (1 l)	NaCl	142,9 mM	8,35 g
	KCl	4,7 mM	0,35 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
	HEPES	20 mM	4,777 g
	200 mM CaCl ₂	1,8 mM	9 ml
	[0,294 g / 10 ml ddH ₂ O]		
	Glukose	5 mM	0,9 g
	→ pH 7,4 (1 M KOH), kühl lagern		
Transportpuffer ohne Na⁺ (1 l)	Cholinchlorid	142,9 mM	19,95 g
	KCl	4,7 mM	0,35 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
	HEPES	20 mM	4,777 g
	200 mM CaCl ₂	1,8 mM	9 ml
	[0,294 g / 10 ml ddH ₂ O]		
	Glukose	5 mM	0,9 g
	→ pH 7,4 (1 M KOH), kühl lagern		
Lysepuffer (1 l)	NaOH	1 N	40,01 g
	SDS	3,5 mM (0,1 %)	1 g
Szintillationsflüssigkeit	Isopropanol		300 ml
	Aqua bidest.		300 ml
	Rotiszint eco plus ®		6000 ml

2.4.2 Proteinbestimmung

Stammlösung für Proteinstandardreihe	BSA (bovines Serum Albumin, Cohn Fraktion V)	2 mg
	Lysepuffer	1 ml
Lösung C	4 % Na ₂ CO ₃	20 ml

(für 100 wells)	1 % CuSO ₄	0,8 ml
	2 % K-Na-Tartrat	0,8 ml
Folin-Lösung (für 100 wells)	Folin & Ciocalteu's phenol reagent	1 ml
	ddH ₂ O	3 ml

2.5 Dünnschichtchromatographie

Platte:	Kieselgel 60F-254, MERCK
Laufmittel:	Butanol, Eisessig, Aqua bi-dest. im Verhältnis 5 / 2 / 3
Scanner:	Isomess IM-3000 Radio-Dünnschicht-Analysator

2.6 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
mSoat ₃₁₇₋₃₃₁ (EPO 52493)	KCRRQHPDCPDVCYE	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (custom antibody)
mSoat ₃₂₉₋₃₄₄ (EPO 52494)	CYEKQPRETSAFLDKG	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien (custom antibody)
E-12: sc-136876	zwischen AS 50 und 100 der mSoat Proteinsequenz (N-Terminus)	Polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
M-14: sc-136877	zwischen AS 325 und 375 der mSoat Proteinsequenz (N-Terminus)	Polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper			
anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Kaninchen IgG-biotinyliert E0432	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
cappel anti-Kaninchen IgG-HRP	Kaninchen IgG (WM)	Ziege	MP Biomedicals, Singapore
Fluoreszenzfarbstoff			
DAPI	Färbung von Zellkernen		Roche Diagnostics, Mannheim

2.7 Immunfluoreszenz

2.7.1 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen

10 x PBS (1 l)	NaCl	1380 mM	80 g
	KCl	27 mM	2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	100 mM	26,8 g
	KH ₂ PO ₄	18 mM	2,4 g
	→ pH 7,4 (HCl), autoklavieren → als 1 x verwenden		
2 % PFA (50 ml)	PFA	2 %	1 g
	ddH ₂ O (50-60°C)		45 ml
	10 x PBS		5 ml
	→ 1-2 Tropfen NaOH zugeben → unter Rühren bei 50°C lösen → pH 6,8-7,2 (HCl)		
Puffer A (110 ml)	Glycin	20 mM	165,22 mg
	1 x PBS		110 ml
Blockierlösung (70 ml)	10x Blocking buffer (Sigma) mit dem Serum (4 %ig), in welcher der 2. AK generiert wurde (Ziege)	4 %	2,8 ml
	ddH ₂ O		60 ml
	10x Blocking buffer (Sigma)		7 ml
DAPI/Methanol 1:5000	DAPI [1 mg/ml in ddH ₂ O]		50 µl
	Methanol		250 ml
Eindeckelmedium	ProLong Gold Antifade, bei RT auftauen, ca 10 µl/ Deckgläschen blasenfrei auftragen und 25 h bei RT trocknen, Lagerung bei 4°C		

2.8 Immunhistochemie

Murine Gewebe: Die Formalin- und Bouin-fixierten Schnitte wurden am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Fachbereich Veterinärmedizin hergestellt und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Bergmann und Frau Dr. Fietz zur Verfügung gestellt. Die SCCx43 Knockout-Maus Hodenschnitte wurden von Prof. Dr. Brehm vom Anatomischen Institut der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

2.8.1 Material, Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

Bouin`sche Lösung	75 ml Pikrinsäure 25 ml Formaldehyd (37 % - 40 %) 5ml Eisessig
Formalin nach Lillie	100 ml Formaldehyd (37 % - 40 %) 900 ml aqua dest. 4 g Natriumhydrogenphosphat 6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Tris-Puffer-Stammlösung (10x)	60,5 g Tris-Base auf ca. 850 – 900ml auffüllen, mit konz. Salzsäure auf ph 7,6 einstellen, auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen, 90 g NaCl zugeben und ph-Wert überprüfen
Tris- Waschpuffer (1x)	100 ml Stammlösung 900 ml Aqua bidest 250 µl Triton-X-100
Citratpuffer	Stammlösung A: 4,2 g Zitronensäure in 200 ml Aqua bidest Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat in 1 l Aqua bidest Fertige Gebrauchslösung: 7 ml Lösung A + 41 ml Lösung B auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen
VECTASTAIN <i>Elite</i> ABC Kit (Biologo, Kronshagen)	5 ml Tris-Waschpuffer 2 Tropfen Reagenz A 2 Tropfen Reagenz B
Universal Staining Kit AEC, Biotin/Streptavidin system (Biologo, Kronshagen)	1 Tropfen AEC 300 µl Substratpuffer (im Kit enthalten)
DAKO-Pen	Dako Cytomation, Hamburg
Sekundärantikörper	Polyclonal Goat anti-Rabbit Immuno- globulins/Biotinylated E 0432 von Dako Cytomation, Hamburg

2.9 Proteinanalyse

2.9.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine)

	Sammelgel (5 ml)	Trenngel (15 ml)	10 %
ddH ₂ O	3,4 ml	6 ml	
30 % Acrylamid Mix	0,83 ml	5 ml	
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml	-----	
1,5 M Tris (pH 8,8)	-----	3,8 ml	
10 % SDS	50 µl	0,15 ml	
10 % APS	50 µl	0,15 ml	
TEMED	5 µl	6 µl	

10 x Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer (1 l)	Tris	250 mM	30,3 g
	Glycin	1920 mM	14,4 g
	SDS	1 %	10 g
	→ pH 8,3 (HCl)		
	→ als 1 x verwenden		

2 x Lämmli Puffer (10 ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim)	SDS	4 %	0,4 g
	Glycerin	20 %	2 g
	β-Mercaptoethanol	10 %	1 ml
	Bromphenolblau	0,004 %	0,4 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,125 M	1,25 ml

4 x Lämmli Puffer (10 ml)	SDS	8 %	0,8 g
	Glycerin	40 %	4 g
	β-Mercaptoethanol	20 %	2 ml
	Bromphenolblau	0,008 %	0,8 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,25 M	2,5 ml

2.9.2 Puffer und Lösungen für Western Blot

Transferlösung (1 l)	1 x Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer		800 ml
	Ethanol	20 %	200 ml

10 x TBS (1 l)	NaCl	1370 mM	12,1 g
	Tris	100 mM	121,2 g
	→ pH 8,0 (HCl)		
	→ als 1 x verwenden		

TBS-T (1 l)	1 x TBS		1 l
	Tween 20	0,05 %	500 µl

Blockierlösung (50 ml)	TBS-T		50 ml
	Milchpulver	5 %	2,5 g

Coomassie-Färbelösung (220 ml)	Coomassie Brilliant Blue R250	0,4 %	0,5 g
	Ethanol	50 %	100 ml
	Essigsäure	10 %	20 ml
	ddH ₂ O		100 ml
Coomassie-Entfärbelösung (1 l)	Ethanol	30 %	300 ml
	Essigsäure	10 %	100 ml
	ddH ₂ O		600 ml

2.9.3 Filmentwicklung

Amersham Hyperfilm ECL

Hypam Schnellfixierer (1:25 in H₂O)
Rodinal B & W Film Developer (1:5 in H₂O)
Eastman Kodak Co. BioMax MR Film

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ilford, Cheshire, England
Agfa, Leverkusen
Sigma, Deisenhofen

2.9.4 Kommerziell erhältliche Kits

Amersham ECL Western Blotting Analysis System

BCA Protein Assay Kit
ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent
Protease Inhibitor Cocktail
Rotilumin 1 & 2

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Novagen, Darmstadt
MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Sigma, Taufkirchen
Roth, Karlsruhe

2.9.5 Längenstandards

Protein-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	11, 17, 28, 36, 56, 72, 95, 130, 230 kDa	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Roti-Mark Western Marker mit Roti-Mark Western-HRP-Konjugat	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 120 kDa	Roth, Karlsruhe

2.10 Chemische Substanzen

2.10.1 Reagenzien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Amersham Amplify	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ammoniumsulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA Fraktion V	Roche, Mannheim
BSA, Cohn Fraktion V	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat Tetrahydrat, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholinchlorid	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DABCO, 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan	Roth, Karlsruhe
DAPI, 4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid	Roche, Mannheim
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
D-MEM	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
DMSO	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's modified eagle's medium (ohne Methionin und Cystein)	Sigma, Steinheim
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure- Na_2	Roth, Karlsruhe
EGTA, Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- tetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
FKS, fetales Kälberserum	Sigma, Taufkirchen
Folin & Ciocalteu's phenol Reagenz	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycerin-gelatine, Kaisers	Merck, Darmstadt
Glycin	Fluka, Steinheim
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Immersion liquid Typ N (Öl für Mikroskopie)	Leica, Wetzlar
IPTG, Isopropylthiogalactosid	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kaliumaspartat	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt

Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Kaninchenserum	DAKO Cytomation, Hamburg
Kollagenase Typ D	Roche Diagnostics, Mannheim
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Membrane blocking agent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver, Blotting grade, fettarm	Roth, Karlsruhe
Mineralöl für Molekularbiologie	Sigma, Steinheim
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
MOPS, 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid	Sigma, Steinheim
N,N-Dimethyl-Formamide (DMF)	Sigma, Steinheim
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, Na_2CO_3	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumgluconat	Fluka, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
N-Methyl-D-glucamine	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd, PFA	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml; 10000 $\mu\text{g/ml}$)	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Pikrinsäure, 98 % reagent grade	Sigma, Steinheim
Poly-D-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S Solution	Sigma, Steinheim
ProLong Gold Antifade	Invitrogen, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Protein A Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Quiagen, Hilden
ProteoJET Mammalian Lysis Reagent	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNA _{later} ®	Quiagen, Hilden
Roti-Load RNA 1,3 x Ladepuffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform Lösung	Roth, Karlsruhe
Rotiszint 22 eco Szintillatoröl	Roth, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, HCl	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig, N_2	Messer, Griesheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tryptone Peptone	Roth, Karlsruhe
Tween 20, Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat	Serva, Heidelberg

Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, Karlsruhe
Xylen Cyanol FF	Sigma, Steinheim
Xylol 100 %	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	DAKO Cytomation, Hamburg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.10.2 Feinchemikalien

1- Ω -Sulfooxyethylpyren, 1omega-SEP	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
2-Sulfooxymethylfurfural	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
2-Sulfooxymethylpyren, 2-SMP	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
4-Methylumbelliferylsulfat	Sigma, Steinheim
4-Sulfooxymethylpyren, 4-SMP	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
7-Ketolithocholat	Biotrend, Zürich, Schweiz
Aldosteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Androstendion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Androsteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSP, Bromosulfophthalein	Sigma, Steinheim
Chenodeoxycholol	Sigma, Steinheim
Cholat	Serva, Heidelberg
Chondroitinsulfat B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Corticosteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cortisol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cortison	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Corticosteron-21-sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cholesterol-3-sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dehydrocholol	Sigma, Steinheim
Dehydroepiandrosterone, DHEA	Sigma, Steinheim
Dehydroepiandrosteron-3-sulfat, DHEAS	Sigma, Steinheim
Deoxycholol	Sigma, Steinheim
Deoxycorticosteron-21-glucosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Digitoxigenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dihydrotestosteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Enalapril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estradiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estradiol-17 β -D-glucuronid	Sigma, Steinheim
Estradiol-3,17-disulfat	Sigma, Steinheim
Estriol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estron-3-sulfat, E ₁ S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Estron-3 β -D-glucuronid	Sigma, Steinheim
Estron	Sigma, Steinheim
Ethinylestradiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Finasterid	Biotrend, Zürich, Schweiz
Flutamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Genistein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycochenodeoxycholol	Sigma, Steinheim
Glycholol	Sigma, Steinheim
Glycodeoxycholol	Sigma, Steinheim
Glycolithocholat	Calbiochem, La Jolla
Glycolithocholat-3-sulfat	Sigma, Steinheim

Glycoursodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Histamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hydroquinonsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Hyocholat, Muricholat	Sigma, Steinheim
Hyodeoxycholat, Murideoxycholat	Sigma, Steinheim
Indoxylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Lithocholat	Sigma, Steinheim
Lithocholat-3-sulfat	Sigma, Steinheim
L-Thyroxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methandrostenolon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumethylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Phenylethylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Phenylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
Prednisolon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prednison	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pregnenolon-3-sulfat, PREGS	Sigma-RBI, Steinheim
Probenecid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Progesteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam
RR-Scymnolsulfat	Prof. Fricker, Heidelberg
Sodiumthioglycolat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tamsulosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taurochenodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Taurocholat	Sigma, Steinheim
Taurodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Taurolithocholat	Calbiochem, La Jolla
Taurolithocholat-3-sulfat, TLCS	Sigma, Steinheim
Tauroursodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Testosteron	Biotrend, Zürich, Schweiz
Ursodeoxycholat	Sigma, Steinheim
Wortmannin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -Naphthylamin	Sigma, Steinheim
α -Naphthylisothiocyanat	Sigma, Steinheim
α -Naphthylphosphat	Sigma, Steinheim
α -Naphthylsulfat	Prof. Glatt, DIfE, Potsdam

Die Betulinderivate PBel-84b, THe 45, EMe I 4, EMe 2, EMe 8, JPE 15B, JPE-33, SAL-II-68, SAL-II-101, SAL-II-138B1, SAL-II-138B2 und SAL-II-156 wurden von Herrn MSc Alakurtti und Prof. Yli-Kauhialuoma, Faculty of Pharmacy, Helsinki, Finnland, zur Verfügung gestellt.

Die Substanzen T 5332717, T 5244339, T 5361670, T 5484220, T 5421128, T 5497238, T 5239532, T 5573915, T 5854015 und T 0511-1698 wurden von der Firma Enamine LTD, Riga, Lettland bezogen.

Die Substanzen S 9087, S 9203, S 0382, S 1647, S 3068, S 8214, S 3740, S 0925, S 1690, S 0960, S 9202, S 0381, S 9086, S 8005 wurden von Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt (Prof. Dr. Dr. Werner Kramer).

2.10.3 Radioaktiv-markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität (Ci/mmol)	Konzentration (µM)	mCi/ml	fmol/dpm
[¹⁴ C] Chenodeoxycholat ^a	0.0513	1949.32	0.1	8.860624
[³ H] Cholat ^e	30	33.33	1	0.015152
[³ H] Cortison ^a	60	16.67	1	0.007576
[³ H] Deoxycholat ^e	38	26.32	1	0.011962
[³ H] DHEAS ^b	79.5	12.58	1	0.005718
[³ H] Estradiol-17β-D-glucuronid ^b	40.5	24.69	1	0.011223
[³ H] Estron-3-sulfat ^b	54.26	18.43	1	0.008377
[³ H] Estron-3β-D-glucuronid ^c	10.3	48.54	0.5	0.044131
[³ H] Glycochenodeoxycholat ^e	14	71.43	1	0.032468
[¹⁴ C] Glycocholat ^g	0.055	3636.36	0.2	8.264545
[³ H] Glycodeoxycholat ^e	29	34.48	1	0.015674
[³ H] Glycoursodeoxycholat ^e	14	71.43	1	0.032468
[³ H] Cortisol ^b	79.28	12.61	1	0.005733
[³ H] Lithocholat ^a	50	20.00	1	0.009091
[³ H] PREGS ^a	20	50.00	1	0.022728
[³ H] Sarkosincholat ^e	10	100.00	1	0.045455
[³ H] Taurin ^a	20	50	1	0.022728
[³ H] Taurochenodeoxycholat ^e	10	100.00	1	0.045455
[³ H] Taurocholat ^e	30	33.33	1	0.015152
[³ H] Taurodeoxycholat ^e	29	34.48	1	0.015674
[³ H] Taurolithocholat ^d	30	1.03	0.031	0.015152
[³ H] Taurolithocholat-3-sulfat ^f	20	8.34	0.1667	0.022728
[³ H] Tauroursodeoxycholat ^e	14	71.43	1	0.032468
[³ H] Ursodeoxycholat ^e	12	83.33	1	0.037879

Hersteller: ^aARC, St. Louis, MO, USA; ^bPerkinElmer, Boston, MA, USA; ^czur Verfügung gestellt durch Dr. B. Ugele, I. Frauenklinik München; ^dSanofi-Aventis, Frankfurt (zur Verfügung gestellt durch Prof. Kramer); ^ezur Verfügung gestellt durch Alan F. Hofmann, University of California, San Diego, USA; ^fRC Tritec AG, Teufen, Schweiz; ^gAmersham, Buckinghamshire, UK.

2.11 Geräte

7300 Real Time PCR System

Analysewaagen:

AE 260 Delta Range

C-30 Microbalance

Precisa 3000C-6000D

Autoklav Sanoclav

Autoklav Systec 3150 EL

Benchmark Microplate Reader

BioPhotometer

Brutschrank

CO₂-Inkubator

Divac 2.4L Vakuumpumpe

Einbetter EG 1160

Electrophoresis Power Supply EPS600

Elektrophorese-Kammern

14,5 x 6,5 cm

35,5 x 11,0 cm

Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409

Fluoreszenz Mikroskop DM5500B

Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution

S/W Kamera DFC340FX

Filter A4 UV

(Ex: BP 360/40, BS: 400, Em: BP 470/40)

Filter L5

(Ex: BP 480/40, BS: 505, Em: BP 527/30)

Filter Y3

(Ex: BP 545/30, BS: 565, Em: 610/75)

Objektiv N PLAN 5x/0.12

Objektiv HCX PL FL 10x/0.25 PH1

Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70

Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0.11-0.23

G24 Environmental Incubator shaker

Gelschlitten

12 x 18 cm

7,5 x 5 cm

HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter

Image Master

Isomess IM-3000 Radio-Dünnschicht-Analysator

Rita Star Instrument control software

Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL 6

Laminar Flow, DanLAF VFR 1806

Laminar Flow, NU-437-500-E

Mikroskop Fluovort

Mikroskop M3Z

Mikroskop ICC50 HD

Neubauer Zählkammer

Operationsbesteck

Applied Biosystems, Darmstadt

Mettler-Toledo, Gießen

Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA

DAK-Oerlikon, Zürich

Wolf, Geislingen

Systec, Wettenberg

Bio-Rad, München

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

New Brunswick Scientific,

Edison, N.J., USA

Leybold, Köln

Leica, Wetzlar

Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK

Werkstatt MZI, Gießen

Pharmacia, Freiburg

Leica, Wetzlar

New Brunswick Scientific,

Edison, N.J., USA

Werkstatt MZI, Gießen

Hanna Instruments, Kehl am Rhein

Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK

raytest GmbH, Straubenhardt, Germany

Heraeus, Hanau

Claus Damm, Fredensborg DK

Nuaire, Plymouth, MN, USA

Leica, Wetzlar

Wild, Heerbrugg

Leica, Wetzlar

Roth, Karlsruhe

Diverse

PALM MicroBeam® mit PALM Robo® Software
 PerfectBlue 'Semi Dry'-Blotter Sedec M 20 cm x 20 cm
 PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L, 20 cm x 20 cm
 PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, 10 cm x 10 cm
 Perkin-Elmer Gene Amp Cyclor Typ 2400
 Schlittenmikrotom SM2000R
 Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)
 Taumler Heidolph Polymax 1040
 Thermocycler Primus 96 advanced gradient
 Ultra-Turrax-Homogenisator T25
 UV-Transilluminator
 Vortex VF 2
 Wärmeplatte
 Wärmeschrank
 Wasserbad
 Wasserbad SW21
 Zentrifugen:
 Kühlzentrifuge 5471
 Megafuge 1.0
 Sorvall Kühlzentrifuge RC5C mit Rotor HB4
 Tischzentrifuge 5415D
 Vakuumzentrifuge Speed Vac SC 110

Zeiss, Oberkochen
 PeqLab, Erlangen
 PeqLab, Erlangen
 PeqLab, Erlangen
 PerkinElmer, Weiterstadt
 Leica, Wetzlar
 Werkstatt MZI, Gießen
 Heidolph, Schwabach
 PeqLab, Erlangen
 IKA, Staufen
 Bachofer, Reutlingen
 Janke und Kunkel, Staufen
 LKB, Bromma, Schweden
 Melag, Berlin
 Memmert, Schwalbach
 Julabo, Seelbach

Eppendorf, Hamburg
 Heraeus, Hanau
 Du Pont, Bad Homburg
 Eppendorf, Hamburg
 Savant, Farmingdale, USA

2.12 Verbrauchsmaterial

12,5 cm² Kulturschalen

12-well Platten
 24-well Platten
 25 cm² Kulturschalen
 6-well Platten
 75 cm² Kulturschalen
 96-well ELISA-Platten
 Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane
 (0,45 µm)
 CryoPure Gefäß
 Deckgläschen, Ø 12 mm
 Einmalhandschuhe
 Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)
 Einwegskalpell
 Faltenfilter 5951/2, Ø 185 mm
 Gel Blotting Paper
 MembranSlide 1.0 PEN Objektträger
 MicroAmp Optical 96 well Reaction plate
 Micro Tube 500
 Nitrilhandschuhe
 Objektträger
 SuperFrost Objektträger
 Pasteurpipetten Assistent

 PCR-tubes, 0,2 ml
 Petrischalen
 Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)
 PonyVial H/I (Minivial)

Becton Dickinson Falcon, Le Pont
 De Caix, France
 greiner bio one, Frickenhausen
 greiner bio one, Frickenhausen
 Sarstedt, Nümbrecht
 greiner bio one, Frickenhausen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Nunc, Wiesbaden
 GE Healthcare, Buckinghamshire,
 UK
 Sarstedt, Nümbrecht
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Sarstedt, Nümbrecht
 megro, Wesel
 Schleicher und Schuell, Dassel
 Schleicher und Schuell, Dassel
 Zeiss, Jena
 Applied Biosystems, Singapur
 Zeiss, Jena
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 R. Langenbrinck, Emmendingen
 Glaswarenfabrik Karl Hecht,
 Sondheim
 ABgene, Epsom, UK
 Nerbe plus, Winsen/Luhe
 Sarstedt, Nümbrecht
 Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)
Rundbodenröhrchen, 14 ml
Schraubdeckelgefäße
Sterilfilter 0,22 µm
Transferpipetten/Liquipetten
Uvetten

Sarstedt, Nümbrecht
Becton Dickinson, Heidelberg
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf, Hamburg

2.13 Bioinformatische Programme und Datenbanken

BLAST, NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Vergleich von Sequenzen gegen Datenbank

Boxshade 3.21

www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Visualisierung von Sequenzalignments

ClustalW

www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html

Sequenzalignments

DAS-TMfilter

<http://www.enzim.hu/DAS/DAS.html>

Vorhersage von TMDs

DNASTar Version 8.0.2, Lasergene, Madison, USA

EditSeq

MegAlign

MapDraw

Bearbeiten von Sequenzen
Sequenzvergleich und Alignments
Ermitteln von Schnittstellen

EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute

www.ebi.ac.uk/Information/sitemap.html

Datenbankportal Europa

Ensembl, EBI

www.ensembl.org

Gen Browser

EXPASy Compute pI/Mw tool

http://web.expasy.org/compute_pi/

Berechnung des Molekulargewicht von Proteinen / Peptiden und des isoelektrischen Punkts

FinchTV (Geospiza)

www.geospiza.com/finchtv/

Auswertung von Sequenzspuren

Genomatix Software Suite, München, Deutschland

GEMS Launcher 5.6

EIDorado 08-2011

MatInspector 8.0.5

Promotorsequenzanalyse

GINA Star TLC™ Version 2.18, Straubenhardt, Deutschland

Radiochromatographisches Anzeige- und Auswertungsprogramm

GraphPad Prism 4, San Diego, CA, USA

www.graphpad.com/prism/pdemo.htm

Berechnung und Darstellung von Kinetiken, Graphiken, statistische Auswertung

HMMTOP 2.0

enzim.hu/hmmtop/

Vorhersage von TMDs

HUGO Gene Nomenclature Committee

<http://www.genenames.org/>

Nomenklatur humaner Gene

NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/	Datenbankportal des National Center for Biotechnology Information, USA (Literaturrecherche, Sequenzsuche)
NetNGlyc 1.0 Server cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	Ermittlung von N-Glykosylierungsstellen
NetPhos 2.0 Server cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	Ermittlung von Phosphorylierungsstellen
MemBrain http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/	Vorhersage von TMDs
MEMSAT-SVM http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	Vorhersage von TMDs
MEMSAT3 http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	Vorhersage von TMDs
MINNOU http://minnou.cchmc.org/	Vorhersage von TMDs
Oligo 4.0 (Wojciech Rychlik, Oslo, Norwegen)	Primerauswahl
OCTOPUS http://octopus.cbr.su.se/	Vorhersage von TMDs
Philius http://www.yeastrc.org/philius/pages/philius/	Vorhersage von TMDs
Phobius http://phobius.sbc.su.se/	Vorhersage von TMDs
PredictProtein www.predictprotein.org/	Vorhersage von TMDs, Phosphorylierungsstellen, N-Glykosylierungsstellen
PRED-TMR2 http://o2.biol.uoa.gr/PRED-TMR2/	Vorhersage von TMDs
Primer Express® Software for Real-Time PCR Version 3.0, Applied Biosystems, Darmstadt	Primer- und Sondenauswahl für die Real-Time PCR
PSORT II http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html	Berechnung der Proteinlokalisierung in der Zelle
SLC Tables www.bioparadigms.org/slc/intro.asp	Übersicht über alle Mitglieder der SLC10-Familie
SOSUI http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/	Vorhersage von TMDs
SPLIT 4.0 http://split4.pmfst.hr/split/4/	Vorhersage von TMDs
SVMtm http://ccb.imb.uq.edu.au/svmtm/	Vorhersage von TMDs
TOPCONS http://topcons.cbr.su.se/	Vorhersage von TMDs
TMAP bioinfo4.limbo.ifm.liu.se/tmap/index.html	Vorhersage von TMDs

TMHMM Server v. 2.0

www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

Vorhersage von TMDs

TMMOD

http://www.molbiol-tools.ca/Protein_secondary_structure.htm

Vorhersage von TMDs

TMPre

ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

Vorhersage von TMDs

TopPred

<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>

Vorhersage von TMDs

TreeView 1.6.6

taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html

Darstellung von Verwandtschaftsdiagrammen

3 METHODEN

3.1 Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie

3.1.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende Lösung wurde in ddH₂O verdünnt, in eine Küvette überführt und im Photometer (Eppendorf) die optische Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) gemessen. Als Leerwert diente der Lösungspuffer der DNA bzw. RNA, der im gleichen Verhältnis wie die entsprechenden Proben mit ddH₂O verdünnt wurde.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

E = Extinktionskoeffizient; E_{DNA} = 50 µg; E_{RNA} = 40 µg

Zusätzlich konnte die Reinheit der DNA bzw. RNA durch Bestimmung der OD₂₈₀ ermittelt werden. Der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für DNA zwischen 1,7 und 2,0 und für RNA über 1,8 liegen.

3.1.2 Native Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden standardmäßig 1 %ige Agarose-Gele verwendet, welche eine gute Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500-10000 bp ermöglichte. Für den Nachweis von DNA-Fragmenten unter 500 bp, wie z.B. bei der durch die LACP-Methode extrahierten cDNA, wurden 2 %ige Agarose-Gele hergestellt. Dazu wurden 1 oder 2 g Agarose in 100 ml 1 x TAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach leichtem Abkühlen auf ca. 60°C das Gel gegossen. Das erhärtete Gel wurde in die mit 1 x TAE (Laufpuffer) gefüllte Elektrophoresekammer überführt und die mit 6 x Ladepuffer vermischten Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung diente der Längenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas) und *GeneRuler Low Range DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific). Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10 V/cm bis die Bromphenolblaufront 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Im Anschluss wurden die Gele 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/µl) gefärbt und 20 min gewässert oder alternativ für 30 min in GelRED-Färbelösung (Biotium) ohne anschließende Wässerung gefärbt. Fotografiert wurde mit dem Image Master (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

3.1.3 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die PCR-Amplifikate aus den PCR-Ansätzen wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt. Dafür wurde der PCR-Ansatz mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt, 500 µl Binding Buffer dazu pipettiert und gut gemischt. Der High Pure Filter wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, die Lösung auf den Filter gegeben und 1 min bei 16100 g (13200 rpm) zentrifugiert. Darauf folgten zwei Zentrifugations-Waschschritte mit 500 µl und 200 µl Wash Buffer. Der anfallende Durchfluss wurde verworfen. Die Elution der gebundenen PCR-Produkte aus dem Filter erfolgte mit 50 µl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) durch Zentrifugation (30 s, 16100 g) in ein neues Auffanggefäß.

3.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit dem Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wurde auf dem UV-Transilluminator betrachtet, die gewünschte DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei DNA-Fragmenten von 100-4000 bp erfolgte die Zugabe von 300 µl Puffer QX1 pro 100 mg Agarosegel und 10 µl resuspendierte QIAEX II Suspension. Das Gemisch wurde 10 min bei 50°C erhitzt und dabei alle 2 min gevortext, um die QIAEX II Kügelchen in Suspension zu halten. Anschließend wurden die QIAEX II Kügelchen durch Zentrifugation bei 16100 g (13200 rpm) für 30 s pelletiert. Nach Abziehen des Überstandes folgten drei Waschschritte: einmal mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit je 500 µl Puffer PE, zwischen denen jeweils zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Nach Trocknung des Pellets erfolgte die Elution der DNA in 25 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) für 5 min bei Raumtemperatur (RT). Die eluierte DNA befand sich nach der Zentrifugation im Überstand und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Überprüfung der aufgereinigten DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.1.5 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung der doppelsträngigen DNA mit Hilfe der Restriktionsendonuklease EcoRI erfolgte nach den Temperatur- und Pufferangaben des Enzymherstellers. Für den Verdau von 1 µg Plasmid-DNA in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden zehn Units des entsprechenden Enzyms (1 µl) und 2 µl des empfohlenen 10x Puffers dazugegeben. Der Ansatz wurde auf 20 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Bei dem Verdau größerer DNA-Mengen wurden die Volumina entsprechend erhöht. Die geschnittene DNA wurde auf einem Agarosegel analysiert.

3.1.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde das *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) angewendet. 4 ml LB-Ampicillin-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 16 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Zum Anlegen einer haltbaren Glycerinkultur wurden 850 µl der Bakteriensuspension mit 150 µl Glycerol vermischt, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden für 2 min bei 16100 g (13200 rpm) zentrifugiert und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer *P1* vollständig resuspendiert. Danach folgte die zügige Zugabe von 250 µl Puffer *P2* und 350 µl Puffer *N3*, wonach jeweils das Reaktionsgefäß zum Mischen invertiert wurde. Das entstandene Präzipitat wurde durch 10-minütige Zentrifugation pelletiert und anschließend der Überstand in eine *Qiaprep* Säule überführt und für 60 s durch die Silikamembran zentrifugiert. Anschließend folgte das Waschen der Säule mit 500 µl Puffer *PB* und 750 µl Puffer *PE*, wobei nach jeder Zugabe 60 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Die Elution der gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl Puffer *EB* (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) oder ddH₂O durch Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß. Die DNA konnte bei -20°C gelagert werden.

3.1.7 Plasmid-Präparationen im Midi-Maßstab

Die Präparation von Plasmiden im Midi-Maßstab erfolgte mit Hilfe des *NucleoBond Xtra Midi-Kits* (Macherey Nagel, Düren) mit einem optimierten Protokoll. Dafür wurden aus einer rekombinanten *E. coli*-Glycerinkultur 50-100 ml LB-Ampicillin-Medium im Verhältnis 1:1000 angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden dann bei 4.300 x g in einem 50 ml Reaktionsgefäß pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer *RES* resuspendiert. Die Zellyse erfolgte mit 10 ml *LYS*-Puffer während einer 5-minütigen Inkubation bei RT. Währenddessen wurden die *NucleoBond Xtra* Säulen, mit integriertem *NucleoBond Xtra* Filter, mit 12 ml *EQU*-Puffer equilibriert. Zur Neutralisierung wurden 10 ml *NEU*-Puffer zum Bakterienlysate gegeben, durch Invertieren gründlich gemischt und auf die angefeuchteten Filter überführt. Anschließend wurde der Filter mit 5 ml *EQU*-Puffer gewaschen und dann verworfen. Die Säulen wurden dann zweimal mit 8 ml *WASH*-Puffer gewaschen. Danach konnte die gebundene Plasmid-DNA in 5 ml *ELU*-Puffer eluiert werden. Um die gewonnene Plasmid-DNA weiter zu entsalzen und zu konzentrieren wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt. Zur Plasmid-DNA wurden 3,5 ml Isopropanol hinzugefügt, gut gemischt und 60 min bei 4.300 x g und 4°C zentrifugiert. Dadurch erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA und es bildete sich ein gut sichtbares Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml 70 %igem Ethanol vorsichtig gewaschen und bei 4.300 x g und 4°C 30 min zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet getrocknet und

anschließend in 200 µl ddH₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte wie in 3.1.1 beschrieben.

3.2 Isolierung und Aufarbeitung von RNA

In dieser Arbeit wurde die aus Zellen und Geweben isolierte RNA nach Transkription in cDNA als Ausgangsmaterial zahlreicher Experimente genutzt, wie z.B. für die quantitative Real-Time PCR, die RACE-PCR und RT-PCR. Da die RNA gegenüber überall bestehenden RNasen sehr empfindlich ist, musste die gesamte Arbeitsfläche mit RNaseZap Wipes und RNase AWAY Reagent (Ambion) gründlich gereinigt werden.

3.2.1 Mäuse und Organentnahme

Alle Mäuse wurden von Charles River Laboratories International (Wilmington, MA, USA) bezogen und anschließend zwei Wochen bei freiem Zugang zu Wasser und Futter unter SPF-Bedingungen (*Spezifiziert-Pathogen-Freie Bedingungen*) gehalten. Zuerst wurde die Expression von mSoat an einer 6 Monate alten CF-1 und BALB/c Maus und einer 3 Monate alten C57BL/6-J Maus bestimmt. Zur Validierung wurden 16 weitere männliche Mäuse (CF-1, C57BL/6-J, FVB/N und 129Sv-Mäuse) getestet. Nach zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose wurde entnommenes Gewebe zerkleinert, in 2 ml vorgewogene Reaktionsgefäße überführt und schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in RNA/ater® gelagert, nachdem die Reaktionsgefäße mit den Geweben nachgewogen wurden, um die Gewebemenge zu bestimmen. Die Lagerung erfolgte bei –80°C bis zur späteren Analyse.

3.2.2 Isolierung von Total-RNA aus Geweben

Für die Isolierung von Total-RNA ist die TRI REAGENT™-Methode von SIGMA benutzt worden. TRI REAGENT™ enthält Guanidinisothiocyanat und Phenol in einer einphasigen Lösung (genauso wie peqGOLD RNA-Pure™, s. 3.2.1.). An den Tagen der RNA-Isolierung wurden die Gewebe aus dem Tiefkühlschrank (-80°C) genommen und in TRI REAGENT™ im Verhältnis 1 ml pro 50-100 mg Gewebe in 15 ml Sarstedt Reaktionsgefäße eingelegt. Bei den in RNA/ater gelagerten Organen wurde das RNA/ater entfernt und TRI REAGENT™ zugegeben. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe eines elektrischen Rotor-Stator-Homogenisators. Das Salz Guanidinisothiocyanat wirkt als chaotropes Agens, das Zellen lysieren und zugleich RNasen vollständig inaktivieren kann. Das Homogenat wurde danach in Form von 1 ml Aliquots in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 200 µl Chloroform je

eingesetztem ml TRI REAGENT™ zugegeben, für 15 s kräftig geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben für 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zugabe von Chloroform und der Zentrifugationsschritt führen zu einer Phasentrennung, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase enthalten ist. Die DNA und Proteine verbleiben dagegen in der unteren organischen Phase bzw. in der Interphase. Die obere Phase wurde abgezogen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol pro eingesetztem ml TRI REAGENT™ zugegeben, die Proben für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat sollte von gelartiger Konsistenz sein und an der unteren Seite des Röhrchens liegen. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol durch Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4°C für 10 min gewaschen. Die Pellets wurden kurz an der Luft getrocknet. Zum Schluss wurden die Pellets in RNase-freiem Wasser gelöst und auf Eis für 30 min resuspendiert.

3.2.3 Isolierung von Total-RNA aus Zellen

Die Zellen wurden in 6 well Schalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm pro well mit oder ohne Tetrazyklin ausgesät. Nach 72 h wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml peqGOLD RNA-Pure™ direkt auf ein well und durch mehrmaliges Aufziehen wurden die Zellen lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 0,2 ml Chloroform zugefügt, durch kräftiges Schütteln 15 s gemischt und auf Eis 5 min inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (5 min, 12000 g, 4°C) separierten sich drei Phasen: eine rote organische Phase, in welcher sich die Proteine befanden, eine Interphase mit der DNA und eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 0,6 ml Isopropanol zugefügt, gemischt, und für 15 min bei 4°C inkubiert und danach 10 min bei 12000 g (4°C) zentrifugiert. Während dieses Zentrifugationsschrittes präzipitierte die RNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Nach Abziehen des Überstandes wurde das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol und Zentrifugation bei 12000 g für 10 min bei 4°C gewaschen. Nach kurzer Trocknung des RNA-Pellets wurde die RNA durch Zugabe von 10 µl DEPC-ddH₂O im Wasserbad bei 55-60°C gelöst und die Konzentration und Reinheit mittels Photometrie und denaturierender Gelelektrophorese bestimmt.

3.2.4 Aufreinigung von polyA⁺-RNA aus Total-RNA

Die proteincodierende mRNA entspricht nur 1 bis 5 % der gesamten RNA einer Zelle. Die mRNA besitzt einen 3'-polyA⁺-Schwanz von 20-250 Adenosin-Nukleotiden (polyA⁺-RNA), über welchen sie aus einer Total-RNA Präparation nach dem Oligotex-Prinzip (Qiagen) aufgereinigt werden kann.

Zuerst wurde die Oligotex-Suspension im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt, dann gevortext und bei RT belassen. Das Wasserbad wurde auf 70°C umgestellt und der Puffer OEB darin aufgewärmt. 250 µg bis 1 mg Total-RNA wurden mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 500 µl Puffer OBB und 30 bis 55 µl Oligotex-Suspension in jede Probe zugegeben. Die Proben wurden beim Pipettieren gut gemischt. Danach wurden die Proben bei 70°C im Wasserbad für 3 min inkubiert und dann bei RT für 10 min inkubiert. Dieser Schritt ermöglicht die Hybridisierung von polyA⁺-RNA mit den Oligo-dT Oligotex-Kügelchen. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen. Die resultierenden Pellets wurden in 400 µl Puffer OW2 durch Vortexen resuspendiert. Währenddessen wurde eine Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Dann wurden die Proben in die Säulen überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Die an den Oligotex-Kügelchen gebundene mRNA bleibt in der Säule hängen, wobei der Durchfluss verworfen wird. Die Säulen wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und mit 400 µl Puffer OW2 gewaschen. Danach wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zuletzt wurden die Säulen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 20-100 µl 70°C warmem OEB-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden durch Pipettieren gemischt und 1 min zentrifugiert. Das resultierende Eluat enthält die polyA⁺-RNA. Anschließend wurde die Konzentration der Proben im Photometer bestimmt.

3.2.5 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA wurde eine Elektrophorese in einem Agarose/Formaldehyd-Gel (denaturierendes Gel) vorgenommen. Da die RNA gegenüber überall bestehenden RNasen sehr empfindlich ist, mussten zuerst Arbeitsfläche, Kammer und Agarose-Schlitten mit 70 % Ethanol und anschließend mit DEPC-Wasser gut abgewischt werden. Danach wurden 1 g Agarose in 40 ml DEPC-ddH₂O und 5 ml 10 x MOPS-Puffer gekocht, bis die Agarose gelöst war. Dann wurde die Lösung auf 50°C abgekühlt und anschließend wurden 7 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben und in den Agarose-Schlitten gegossen. Auspolymerisierte Gele wurden in die mit 1 x MOPS-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. 1 µg RNA wurde mit 1,3 x Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth) versetzt, bei

68°C für 10 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Längenstandard dienten 3 µl *peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter* (Peglab) gemischt mit 6 µl Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth). Der Einlauf der Proben erfolgte bei 30 mA für 15 min mit einer anschließenden Auftrennung der RNA bei 60 mA. Nach Färbung mit Ethidiumbromid konnte das Gel unter dem UV-Transilluminator begutachtet und fotografiert werden. Reine, nicht-degradierte RNA zeigt zwei Banden, eine bei ~1800 bp (18S-rRNA) und eine bei ~5000 bp (28S-rRNA). Eine Degradation der RNA zeigt sich als Schmier auf dem angefärbten Agarosegel.

3.2.6 DNase Verdau

Mit der DNase Behandlung wird ein verbleibender Rest von genomischer DNA verdaut. Falls ein DNase Verdau für eine quantitative Real-Time PCR erforderlich war, wurde folgender Ansatz mit der RNase-freien DNase I (Fermentas) hergestellt:

RNA	5 µg
10X Puffer mit MgCl ₂	1 µl
DEPC behandeltes Wasser	auf 9 µl auffüllen
DNase I, RNase-frei (1u/µl)	1 µl

Dieser Ansatz wurde für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1µl 25mM EDTA erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min. bei 65°C. Dieser Ansatz wurde zur cDNA Synthese verwendet.

Um eine höhere Konzentration von cDNA zu erreichen, wurde bei der durch die LACP-Methode extrahierten RNA eine abweichende DNase-Behandlung mit höher konzentrierter DNase I (10 U/µl von Applied Biosystems) durchgeführt. Folgender Ansatz wurde in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

DNase I -Puffer	2 µl
DNase I, RNase-frei (10 U/µl)	1 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl
RNA	6,65 µl

Der Ansatz wurde kurz anzentrifugiert und im Wasserbad für 25 min bei 37°C und zur Inaktivierung der DNase I für 10 min bei 75°C inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz bei 4°C inkubiert, bei -20°C gelagert und zur cDNA-Synthese eingesetzt.

3.2.7 cDNA-Synthese aus Total- und poly A⁺-RNA

Für die cDNA-Synthese wurde das *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Invitrogen benutzt. Als Ausgangsmaterial können laut Herstellerangaben 1 pg – 5 µg Total-RNA oder 1 pg – 500 ng polyA⁺-RNA eingesetzt werden. Für die Vergleichbarkeit in der quantitativen Real-Time PCR wurden generell 5 µg Total-RNA umgeschrieben. Dafür wurde die berechnete µl Menge, die 5 µg Total-RNA ergab, in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 1 µl einer 10 mM dNTP Mischung, und 1 µl *oligo (dT)₂₀ (50 µM)* oder *random hexamer (50 ng/µl)* Primern vermennt und auf 10 µl mit DEPC behandeltem H₂O aufgefüllt. Danach erfolgte eine Inkubation von 5 min im Wasserbad bei 65°C, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, mit anschließender Kühlung bei 4°C. Währenddessen wurde eine cDNA-Synthesemischung in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert:

10x RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT TM (40 U/µl)	1 µl
SuperScript TM III RT (200 U/ µl)	1 µl

Diese cDNA-Synthesemischung wurde der RNA/Primer/dNTP-Mischung zugegeben, vorsichtig durch Pipettieren durchgemischt und bei oligo(dT)-Primern für 50 min bei 50°C, und bei Hexamer-Primern für 10 min bei 25°C, gefolgt von 50 min bei 50°C im Wasserbad, inkubiert. Die reverse Transkription wurde bei 85°C für 5 min beendet und auf Eis abgekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde 1 µl RNase H pro Reaktion zugegeben, für 20 min bei 37°C inkubiert und die cDNA anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.8 Laser-assisted cell picking (LACP) und Extraktion von RNA

Durch die LACP-Methode können verschiedene Zellpopulationen eines Gewebe isoliert und molekularbiologisch untersucht werden (Espina et al. 2007). Das Gerät PALM MicroBeam mit der Software PALM Robo von Zeiss AG (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Prof. Dr. Meinhardt, Zugang durch Prof. Dr. Bergmann) wurde benutzt, um bestimmte Areale eines histologischen Präparates, welches auf einem mit Folie beschichteten Objektträger (MembranSlide 1.0 PEN, Zeiss) aufgebracht ist, zu markieren und mit einem Kaltlaser herauszuschneiden. Durch die laser microdissection and pressure catapulting-Technik (LMPC) wurde das herausgeschnittene Areal in einem speziellen Probengefäß (MicroTube 500, Zeiss) in

einem Mineralöltropfen gesammelt (weiterführende Informationen siehe Dissertation Fietz, 2011).

3.2.8.1 Herstellung der Präparate

Vor Verwendung wurden die MembranSlide 1.0 PEN Objektträger für 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Das Mikrotom wurde mit 70 %igem Alkohol gereinigt, das Paraffinblöckchen mit einer sterilen Einmalklinge angeschnitten, 5 µM dicke Paraffinschnitte hergestellt und zum Glätten in ein 50°C warmes gereinigtes Wasserbad mit sterilem Aqua bidest. gegeben. Danach wurden die Schnitte auf die Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 56°C im Wärmeschrank getrocknet und luftdicht verpackt gelagert. Als Nächstes wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe mit Xylol und Ethanol p.a. entparaffiniert:

- 1) Auftropfen von reinem Xylol für 2 x 2 min
- 2) Auftropfen von 100 %igem Alkohol p.a. für 1 min
- 3) Auftropfen von 96 %igem Alkohol p.a. für 1 min
- 4) Auftropfen von 70 %igem Alkohol p.a. für 1 min
- 5) Auftropfen von autoklaviertem DEPC-Wasser für 1 min

Das Färben der Schnitte mit Hämalaun nach Mayer erfolgte durch Auftropfen von sterilfiltriertem Hämalaun für 30-45 s, Abspülen des Hämalauns mit autoklaviertem DEPC-Wasser und einer Wässerung für 30s. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol für jeweils 10 s durch Auftropfen von 70 %igem, 96 %igem und schließlich 100 %igem Alkohol p.a. Der Transport der Objektträger erfolgte in einer sterilen Glasküvette.

3.2.8.2 Durchführung des LACP

Nach Bewertung der Morphologie des Gewebes durch Sichtkontrolle wurden die Areale von Interesse markiert, mittels eines Laserstrahls mit der Folie verschmolzen, ausgeschnitten und in den Deckel eines Probengefäßes geschleudert. Der Deckel des Probengefäßes wurde mit 2,5 µl Mineralöl benetzt, um die Anheftung der Gewebestücke zu erleichtern. Nach der Gewinnung wurde das Probengefäß bei -80°C gelagert. Auf diese Weise wurden z.B. das Bronchialepithel und das Alveolarepithel voneinander getrennt, wobei das Alveolargeewe zwar sauber vom Bronchialepithel getrennt werden konnte, umgekehrt eine reine Gewinnung des Bronchialepithels ohne kleinen Anteil des Alveolargeewe nicht möglich war; dasselbe Problem stellte sich beim Heraustrennen des Uroepithels der Blase dar. Im Hoden

dagegen fand morphologisch bedingt eine saubere Trennung der Tubulus- und Interstitiumbereiche statt.

3.2.8.3 Extraktion von RNA

Zur Extraktion von RNA wurde das RNeasy FFPE Kit von Quiagen verwendet. Das Gewebe wurde durch eine Inkubation mit Proteinase K und dem Lyse-Puffer (PKD-Puffer, enthalten im Kit) über Nacht bei 56°C im Wasserbad verdaut. Am nächsten Tag wurden die Formalinverlinkungen durch Erhitzen der Proben für 15 min bei 80°C zerstört und die Proteinase deaktiviert. Nach Bindung der RNA an die Silikonmembran der mitgelieferten Säulen (für Einzelheiten siehe Protokoll RNeasy FFPE, Quiagen) erfolgten mehrere Waschschriffe. Die gebundene RNA wurde durch Zugabe von RNase freiem Wasser und anschließender Zentrifugation in Lösung gebracht und bei -80°C gelagert. Die Umschreibung in cDNA erfolgte wie in Kap. 3.2.6 und 3.2.7 beschrieben.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifisch ausgewählter DNA-Abschnitte. Diese Reaktion wird durch das Enzym DNA-Polymerase katalysiert, das entlang eines DNA-Einzelstranges, welcher als Matrize dient, aus monomeren dNTP's einen komplementären Strang synthetisiert. Ausgangspunkt der Synthese sind genspezifische Primer. In sich wiederholenden Zyklen aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wird der durch die Primer bestimmte Genabschnitt vervielfältigt. Dabei dienen die Produkte der vorangegangenen Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus und ermöglichen so eine exponentielle Vermehrung der DNA. Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend zum Expressionsnachweis eingesetzt.

3.3.1 Allgemeine Regeln zur Primerauswahl

Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms *Oligo 4.0*. Dabei wurden, soweit möglich, folgende generelle Rahmenbedingungen eingehalten:

- Die Primer trugen an ihrem 3'-Ende ein AC, AG, TC oder TG.
- Der (G+C)-Gehalt der Primer lag zwischen 50-60 %.
- Um Dimerbildungen zu vermeiden, waren insbesondere die 3'-Enden der Primer nicht untereinander und nicht mit sich selbst komplementär.
- Um Sekundärstrukturen im Primer zu vermeiden war ΔG für eine Loopbildung >0 .

Die Primer für Expressionsprofile wurden in einer Länge von 20-25 Basen ausgewählt, die einen Amplifikationsbereich zwischen 300-1000 bp umfassten; bei der durch LACP-Methode erhaltenen cDNA sollten die Primer dagegen einen Amplifikationsbereich von ca. 150 bp umfassen. Die Schmelztemperatur T_m beider Primer lag nicht mehr als 2°C auseinander. Mit einer BLAST-Analyse wurde die Sequenzspezifität der gewählten Primer überprüft. Die Synthese der Primer wurde von der Firma *MWG-Biotech* (Ebersberg) und *Metabion* (Martinsried) durchgeführt.

3.3.2 PCR-Reaktionsansatz

Verschiedene Polymerasen kamen je nach PCR-Anwendung zum Einsatz. Das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) und die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) wurde bei benötigter hoher Lesegenauigkeit ausgewählt, da die Polymerasen eine 3'→5' Exonukleaseaktivität aufweisen. In PCR-Reaktionen, bei denen eine hohe Ausbeute gewünscht war (z.B. RT-PCR), wurden die *AmpliTaQ Gold DNA Polymerase* (Applied Biosystems), und die *Thermoprime Plus DNA Polymerase* (ABGene) verwendet. Für jede Polymerase wurde ein speziell optimiertes Puffersystem eingesetzt. Die Reaktionsansätze für eine Probe setzten sich wie folgt zusammen:

	Expand High Fidelity	Phusion High Fidelity	AmpliTaQ Gold	Thermoprime Plus
Enzym	0,75 µl	0,5 µl	0,25 µl	0,5 µl
10 x Puffer	10 µl	(5x) 10 µl	5 µl	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	-	-	3 µl	6 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	1 µl	2 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	1 µl	2 µl
DNA (cDNA, Plasmid-DNA)	5-10 µl	5-10 µl	5-10 µl	5-10 µl
ddH ₂ O	ad 100 µl	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 100 µl

Bei größeren Versuchsansätzen wurde aus den oben genannten Reagenzien ein Master Mix vorbereitet und zu jeder DNA-Probe gegeben. Die Amplifikation erfolgte von 5-10 µl cDNA oder Plasmid-DNA (50 ng). Die Proben wurden gemischt, herunter zentrifugiert und in einem *Perkin-Elmer Gene Amp Cyclor Typ 2400* (PerkinElmer) oder *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (PeqLab) die PCR-Bedingungen nach Anleitung der jeweiligen Polymerase beachtet.

3.3.3 Touchdown-PCR

Die Methode der Touchdown-PCR wurde gewählt, um die Vorteile einer höheren Spezifität bei hoher Anlagerungstemperatur (AT) und einer größeren Ausbeute bei niedriger AT in einem Versuchsansatz zu kombinieren. Dafür wurde zunächst eine AT gewählt, die nahe am Schmelzpunkt der Primer liegt ($T_m - 2^\circ\text{C}$) und dann in den ersten 10 Zyklen um $0,5^\circ\text{C}$ pro Zyklus reduziert. In einem weiteren Amplifizierungsschritt wurden dann weitere 30 Zyklen bei einer konstanten AT ($T_m - 7^\circ\text{C}$) durchgeführt, wobei die in den ersten Zyklen gebildeten spezifischen Amplifikationsprodukte weiter vermehrt wurden.

3.3.4 Nested-PCR

Die Nested-PCR ist eine hocheffiziente PCR Methode, bei der zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt werden. Dabei dient ein Aliquot aus der ersten PCR als Template für die zweite PCR. Das Primerpaar der zweiten PCR bindet an Sequenzbereiche innerhalb des bei der ersten PCR gebildeten Ampifikats. Durch die gesteigerte Empfindlichkeit und Effizienz dieser Methode können auch geringste Mengen cDNA nachgewiesen werden. Dieses PCR-Verfahren wurde bei der RACE-PCR genutzt, da bei dieser nur geringe Mengen RNA, und damit auch cDNA, gewonnen werden konnten. Als Ausgangsprodukt für die zweite PCR diente 1 μl PCR-Produkt aus einer vorangegangenen RT-PCR. Die Amplifizierung erfolgte mit einem Touchdown Protokoll. Um DNA-Kontaminationen der Proben zu vermeiden wurde auf eine äußerst saubere und kontaminationsfreie Arbeitsweise geachtet. Dies beinhaltete die Verwendung neuer RNA und DNA-freier Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen. Alle Pipettierschritte wurden unter einer UV-Kammer mit zuvor UV-bestrahlten Pipetten durchgeführt. Um mögliche DNA-Kontaminationen zu erkennen, wurde bei allen Schritten eine Wasserkontrolle mitgeführt.

3.3.5 RACE-PCR

Die RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) dient der Gewinnung unbekannter Genabschnitte durch Verlängerung bekannter Abschnitte in Richtung des 5'- oder 3'-Endes der transkribierten RNA. Die RLM-RACE (RNA ligase-mediated-RACE) wurde mit dem GeneRacer Kit von Invitrogen entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurde zunächst polyA⁺-RNA aus dem Testis-Gewebe des Ebers isoliert und mit CIP (calf intestinal phosphatase) dephosphoryliert, wobei jegliche trunkierte mRNA eliminiert wird, ohne die gecappte, intakte mRNA zu beschädigen. Im Anschluss wurde die dephosphorylierte RNA mit TAP (tobacco acid pyrophosphatase) behandelt, um die 5'-cap Struktur der intakten mRNA zu entfernen, da das 5'-Ende für die Ligation mit dem GeneRacer RNA Oligo frei sein musste. Das GeneRacer RNA Oligo wurde dann mithilfe der T4-RNA-Ligase an das freie 5'-Ende

ligiert, wodurch man ein bekanntes 5'-Ende zur Anlagerung der GeneRacer Primer erhält. Anschließend wurde mit der SuperScript III Reversen Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben. Um das 5'-Ende zu erhalten wurde mit dem GSPR (gene specific reverse primer = Rückwärtsprimer) und dem GeneRacer 5'-Primer amplifiziert. Um das 3'-Ende zu erhalten, wurde mit dem GSPF (gene specific forward primer = Vorwärtsprimer) und dem GeneRacer 3'-Primer amplifiziert. Die erhaltenen Banden wurden ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit, den im GeneRacer Kit enthaltenen S.N.A.P. Aufreinigungssäulen oder mit dem Qiaex II Kit aufgereinigt. Das aufgereinigte Produkt wurde danach mit den genspezifischen Nested-Primern nochmals amplifiziert. Für die Sequenzierung wurden die aufgereinigten Produkte in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert.

3.3.6 Quantitative Real-Time PCR

Die Überprüfung der Expression von mSoat, NTCP, ASBT und SOAT mit den endogenen Kontrollen mHprt1, mB2m bzw. ACTB erfolgte mittels quantitativer PCR unter Verwendung des folgenden Reaktionsmixes in einer 96-well Platte. Diese Assays, mit 20-fach konzentrierten Primern und 6-FAM markierten Sonden sowie Formamid als Stabilisator waren bereits vorgefertigt erhältlich (Applied Biosystems):

ddH ₂ O	6,25 µl
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	12,5 µl
<i>TaqMan Gene Expression Assay</i>	1,25 µl
cDNA	5 µl

Die nicht vorgefertigt erhältlichen Assays des Schweins susSoat, susHprt1 und susTbp, sog. *made to order* Assays, wurden auf Kundenwunsch speziell von Applied Biosystems angefertigt. Dafür wurden die Primer und Sonden mit Hilfe des Programms Primer Express® Software for Real-Time PCR Version 3.0 ausgesucht. Eine Endkonzentration von 900 nM je Primer und 250 nM der Sonde im Reaktionsansatz werden empfohlen. Die Primerkonzentration und die Sondenkonzentrationen waren beide 10 µM, woraus sich folgender Reaktionsansatz ergibt:

ddH ₂ O	2,375 µl
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	12,5 µl
<i>Sonde</i>	0,625 µl
<i>GSPF (Gen-spezifischer Primer vorwärts)</i>	2,25 µl
<i>GSPR (Gen-spezifischer Primer rückwärts)</i>	2,25 µl
cDNA	5 µl

Der Universal MasterMix enthält bereits Puffer, $MgCl_2$, dNTPs, den Kontroll-Fluoreszenzfarbstoff ROX und Polymerase. Die 96-well Platte wurde verschlossen, zentrifugiert und die PCR-Reaktion im ABI PRISM 7300 nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	95°C	10 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 s	
Primer-Anlagerung	60°C	1 min	
Kühlung	4°C	∞	

Für alle Assays wurde eine Standardreihe bestimmt; diese gibt Auskunft über die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der einzelnen Assays untereinander. Die cDNA wurde dafür logarithmisch über fünf Zehnerpotenzen verdünnt und eine Real-Time PCR durchgeführt. Bei der Auswertung der Standardkurve wird darauf geachtet, dass die Assays möglichst parallel verlaufen und eine Gerade abbilden.

Für einen Vergleich der Expression von Genen auf mRNA-Ebene wird zunächst RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (two step RT-PCR). Bei der Real-Time PCR wird bei jedem PCR Zyklus ein Fluoreszenzsignal gemessen, welches proportional zur amplifizierten cDNA, also 2-fach pro Zyklus, ansteigt. In dieser Arbeit wurden MGB-Sonden verwendet. Diese Sonden binden mit einem Protein, dem Minor-groove-binder, in die kleine Furche des entstehenden DNA-Doppelstranges, die bei der Hybridisierung der terminalen Basenpaare der Sonde an die vorliegende Einzelstrang-DNA entsteht. Dadurch wird die Bindung der Sonde stabiler und somit die Nutzung kürzerer Sonden möglich (Kutyavin et al. 2000). Zudem besitzen die MGB-Sonden einen sog. Dark Quencher, das heißt hier wird die Fluoreszenz der nicht gebundenen Sonde, im Gegensatz zu TAMRA gequenchten Sonden, durch einen nicht-fluoreszierenden Stoff unterdrückt. Mit nicht-fluoreszierenden Quenchern entsteht weniger Hintergrundfluoreszenz als mit fluoreszierenden Quenchern, was zu präziseren Ergebnissen führt. Das Prinzip der Real-Time PCR ist, dass mit jedem amplifizierten cDNA-Strang ein Fluoreszenzfarbstoff abgespalten wird und somit die Fluoreszenz proportional zum entstehenden DNA Produkt steigt (Heid et al. 1996). Durch die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase wird die hybridisierte Sonde gespalten. Anschließend lagern sich Primer und Sonde an die Zielsequenz an. Die Fluoreszenz des Farbstoffes *Fam* an der Sonde wird durch die räumliche Nähe zum Quencher (Q) unterdrückt. Während der Verlängerung des Primers gelangt die Taq-Polymerase an das 5'-Ende der angelagerten Sonde. Durch ihre 5'→3' Exonukleaseaktivität baut sie die Sonde ab und der Farbstoff *Fam* kann sich vom Quencher entfernen. Nach Anregung von *Fam* kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die relative Expression wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmt. Der ΔC_T -Wert wurde bestimmt, indem der *signal threshold cycle* (C_T) der endogenen Kontrolle (z.B. mHprt1) von dem C_T -Wert des Transporters subtrahiert wurde. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert wurde errechnet, indem der ΔC_T -Wert der Zellen oder Gewebe mit der niedrigsten Expression des Zielgens von den

ΔC_T -Werten der Zellen oder Gewebe mit einer höheren Expression des Zielgens abgezogen wurde. Anschließend erfolgte die Transformation nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Dieser Wert gibt die n-fache Expression des Transporters im Vergleich zu einer gewählten Kontrolle mit niedriger Expression.

3.4 DNA-Klonierung

Die Integration von DNA in einen Vektor (Plasmid) und deren Einbringung in eine Bakterienzelle wird als DNA-Klonierung bezeichnet. Die Bakterien, die Fremd-DNA aufgenommen haben, werden über Antibiotika-Resistenzen selektioniert. Diese Bakterien können in hoher Zahl vermehrt und die Plasmide daraus isoliert werden. In dieser Arbeit wurde die durch die RACE-PCR erhaltene Soat-Sequenz des Schweins in den pCR4-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert.

3.4.1 TOPO-Klonierung

Zum Einbringen von DNA in den TOPO-Vektor wurde mit Hilfe der *Expand High Fidelity* (Roche) ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhang amplifiziert. Es folgte das Mischen von 4 µl dieses PCR-Produkts mit 1 µl *Salt Solution* (Invitrogen) und 1 µl TOPO-Vektor (pCR4-TOPO-Vektor) und eine 5-minütige Inkubation bei RT mit anschließender Abkühlung auf Eis. Die linearisierten TOPO-Vektoren enthalten einen 3'-T-Überhang und eine kovalent gebundene Topoisomerase I. Während der Inkubationszeit findet die Ligation von Vektor und PCR-Produkt über die komplementären Enden statt, wobei die Topoisomerase abgespalten wird. Für die Transformation wurden 2 µl der TOPO-Klonierungsreaktion eingesetzt oder der Ansatz bei -20°C aufbewahrt.

3.4.2 Transformation

Das Einbringen der rekombinierten Plasmide in die Wirtszelle erfolgte durch Hitzeschock-Transformation. Hierzu wurde ein Aliquot der kompetenten TOP10 Bakterien (Invitrogen) auf Eis aufgetaut, 2 µl des TOPO-Klonierungsansatzes zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für genau 30 s bei 42°C durchgeführt und anschließend die Probe für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) (37°C) wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C und 225 rpm im Warmluftinkubator geschüttelt und anschließend 25 µl, 75 µl und 200 µl des Ansatzes auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Das Ampicillin-Resistenz-Gen im transformierten Plasmid gewährleistete, dass während der Bebrütung (37°C, 16 h) nur Bakterien vermehrt wurden, die das Plasmid aufgenommen hatten. Einzelne Bakterienkolonien wurden vermehrt und die

enthaltenen Plasmide über eine Minipräparation aufgereinigt. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte über Kontrollverdau und Sequenzierung.

3.4.3 Die Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression

Die NTCP-, ASBT-, SOAT- und mSoatHEK293-Zelllinien lagen bereits stabil transfiziert vor. Zur Integration des jeweiligen Gens in das Genom einer eukaryotischen Wirtszelle wurde das Flp-In System der Firma Invitrogen angewendet. Spezielle Flp-In T-REx-HEK293-Zellen besitzen eine im Genom integrierte *FRT* site (Flp Rekombinase Erkennungsstelle), durch die kompatible Plasmide, die ebenfalls eine *FRT* site enthalten, integriert werden können. SOAT, NTCP und ASBT wurden in den pcDNA5/FRT/TO-Vektor kloniert (Döring, Dissertation 2010), der mSOAT in den pcDNA9-Vektor. Eine Kotransfektion dieser Expressionsplasmide mit dem zu untersuchenden Gen erfolgte jeweils zusammen mit dem pOG44-Vektor. Durch das integrierte Hygromycin-Resistenzgen können transfizierte Zellen selektioniert werden. Neben der *FRT* site haben die Flp-In T-REx-HEK293-Zellen zusätzlich das Plasmid pcDNA6/TR (Invitrogen) stabil integriert, wodurch sie unter Kontrolle eines CMV-Promotors einen Tetrazyklin-Repressor (tetR) exprimieren. Das durch die stabile Transfektion in die Zellen eingebaute Tetrazyklin-regulierte Expressionsplasmid pcDNA5/FRT/TO enthält zwischen CMV-Promotor und dem proteinkodierenden Gen zwei *Tetracycline-Operator sites* (TetO₂). An diese lagert sich jeweils ein tetR-Homodimer an, wodurch die Transkription des Gens verhindert wird. Nach Zugabe von Tetrazyklin führt dessen Anlagerung an die tetR-Homodimere zu einer Konformationsänderung. Die tetR-Homodimere lösen sich vom TetO₂ und das zu untersuchende Gen kann transkribiert werden. Die Tetrazyklin-Induktion sollte ca. 72 h vor einer funktionellen Untersuchung des rekombinanten Proteins durchgeführt werden (Döring, Dissertation 2010). Die optimale Tetrazyklin-Konzentration zur Induktion der Proteinexpression beträgt 1 µg/ml. Die Flp-In T-REx-HEK293-Zellen werden zukünftig als FlpIn-HEK293-Zellen erwähnt und abgekürzt.

3.5 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren

Die Firmen Genterprise Genomics (Mainz) und GATC Biotech (Konstanz) führten die Sequenzierung der DNA durch. Für Genterprise wurden 170-350 ng Plasmid-DNA mit 1 pmol Primer in einem 200 µl PCR-Tube mit flachem Deckel gemischt, mit ddH₂O auf 6 µl aufgefüllt und anschließend zur Sequenzierung verschickt. Für GATC wurden 30-100 ng/µl Plasmid-DNA oder 10-50 ng/µl PCR-Produkt in 30 µl Wasser gelöst und in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß versandt. Die Sequenzierprimer wurden mit einer Konzentration von 10 pmol/µl in einem zusätzlichen 1,5 ml Gefäß versandt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden per e-mail im

FASTA-Format und als Chromatogramm zugesendet. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen *DNAstar* und *FinchTV*.

3.6 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der FlpIn-HEK293-Zellen und der daraus hervorgegangenen stabilen Zelllinien erfolgte nach den allgemeinen Techniken sterilen Arbeitens. Die Zellen wurden standardmäßig in HEK293-Medium unter 95 % Wasserdampfsättigung, 5 % CO² und bei 37°C kultiviert. Die FlpIn-HEK293-Zellen wurden regelmäßig mit Zeocin und Blasticidin selektiert und die stabilen Zelllinien mit Hygromycin B und Blasticidin.

3.6.1 Passagieren und Aussäen der Zellen

Zum Erhalt der Zellkultur wurden die Zellen in 75 cm² Kulturschalen vermehrt, wobei bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % eine Splittung erfolgte. Dazu wurde das Medium abgezogen, die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 1 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben, dieses gut verteilt und für 1 min bei 37°C inkubiert. Durch Klopfen an der Kulturschale konnten die Zellen vom Untergrund abgelöst und anschließend die Trypsinierung durch Zugabe von 2 ml HEK293-Medium gestoppt werden. Das Vereinzeln noch vorhandener Zellklumpen erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension. Je nach Bedarf wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:10 in eine neue Kulturschale oder nach Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Kammer gleichmäßig in 6-, 12- oder 24-well Schalen ausgesät. Die well-Schalen wurden vor dem Aussäen für 30 min mit Polylysin inkubiert, das Polylysin abgezogen und die Zellen auf die noch feuchte Oberfläche gegeben. Dies erhöhte die Adhärenz der FlpIn-HEK293-Zellen am Boden.

3.6.2 Einfrieren der Zellen

Nach dem Abtrypsinieren der Zellen wurden 900 µl Zellsuspension in Cryovials, welche 100 µl DMSO enthielten, überführt und gut vermischt. Zum langsamen und kontrollierten Einfrieren der Zellen wurden diese in einer Styroporschachtel zunächst für 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend zur Langzeitkonservierung in flüssigem N₂ gelagert.

3.6.3 Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen in den Cryovials erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C. Kurz bevor die Zellen komplett aufgetaut waren, wurde die Außenseite des Cryovials mit 70 %igem Ethanol dekontaminiert und die Zellen unter der Sterilwerkbank zunächst in eine 25 cm² Kulturschale mit 5 ml Normalmedium überführt. Nach Absetzen der Zellen am Boden (nach

einigen Stunden) konnte vorsichtig das Medium gewechselt werden, um so das DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Waren die Zellen 80-90 % konfluent, wurden sie in eine 75 cm² Kulturschale passagiert.

3.7 Transportmessung an HEK293-Zellen

Aufnahmemessungen erfolgten an stabil transfizierten HEK293-Zellen. Bei den Zellen, die für eine Proteinexpression auf Tetrazyklin angewiesen sind (+Tet), wurden die Zellen 72 h vor der Messung mit Tetrazyklin behandelt, da die optimale Transportrate nach einer 72-stündigen Tetrazyklininduktion festgestellt worden war (Döring, Dissertation 2010). Als Negativkontrollen wurden FlpIn-HEK293-Zellen verwendet.

3.7.1 Versuchsvorbereitung

Zur Herstellung der Messlösung wurde zuerst eine konzentrierte Stammlösung berechnet, die aus einem radioaktiv markierten Anteil und einem unmarkierten Anteil der zu messenden Substanz bestand. Die radioaktiv markierten Substanzen, die meist in Ethanol oder Methanol gelöst waren, wurden mit N₂ abgedampft, bzw. bei kleinen Mengen das Abdampfen durch Lagern mit geöffnetem Reaktionsgefäß unter dem Isotopenabzug herbeigeführt und danach bei 37°C in Transportpuffer mit oder ohne Natrium gelöst und die berechnete Konzentration mit in DMSO gelöster unmarkierter Substanz eingestellt. Die Messlösung wurde durch weitere Verdünnung mit Na⁺-haltigen und/oder Na⁺-freien Transportpuffern hergestellt und so die berechnete Endkonzentration erreicht. Die Zellplatten wurden, um ein zeitgenaues Pipettieren der Messlösungen bzw. Stoppen der Messungen zu garantieren, mit Hilfe eines heißen Drahtes in Einzelwells bei Affinitätsmessungen, ansonsten in sechs 4er- Reihen bei 24 well Zellkulturschalen, unterteilt.

3.7.2 Transportmessung

Zu Beginn der Aufnahmemessung wurde das Medium von den Zellen abgezogen, die Zellen dreimal mit 37°C warmem PBS oder Na⁺-freiem Transportpuffer gewaschen und für ca. 10 min in 1 ml des jeweiligen Transportpuffers (z.B. Na⁺-haltig, Na⁺-frei) auf einer Wärmeplatte bei 37°C equilibriert. Nach Abziehen des Transportpuffers wurden die Transportmessungen durch Zugabe von 300 µl (bei 24-well Platten) oder 500 µl Messlösung (bei 12-well Platten) gestartet, die Zellen für die anberaumte Zeitspanne inkubiert und danach zum Beenden der Aufnahme die Messlösung abgekippt und die Zellen fünfmal in eiskaltem PBS gewaschen.

3.7.3 *cis*-Hemmung und Ermittlung der IC₅₀-Werte

Die Substratbindungsstelle eines Transportproteins kann durch Interaktionen inhibierender Substanzen besetzt werden, so dass die Aufnahme des regulären Substrats eingeschränkt wird. Wenn sowohl der Inhibitor als auch das Substrat auf der gleichen extrazellulären Seite zugegeben werden, spricht man von *cis*-Hemmungen. In dieser Arbeit erfolgte ein Screening von inhibierenden Substanzen an mSoat-HEK293-Zellen sowie zur Erstellung eines Pharmakophormodells für SOAT ein Screening von mehr als 100 Substanzen mit Bestimmung der entsprechenden IC₅₀-Werte. Für beide Experimente wurde der gleiche Versuchsablauf durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, dass beim Screening nur eine hohe Konzentration, und zur Bestimmung der IC₅₀-Werte acht verschiedene Konzentrationen zwischen 10 nM bzw. 100 nM und je nach Löslichkeit bis zu 100 bzw. 1000 µM eingesetzt wurden. Da die Wasserlöslichkeit für einige lipophile Substanzen ungenügend war, wurden alle Verdünnungen auf eine 2 %ige DMSO Konzentration eingestellt. Generell wurde darauf geachtet, daß die Messungen von Positiv- und Negativkontrollen ohne Hemmsubstanz ebenso mit einer 2 %igen DMSO Konzentration erfolgten. Violante et al. (2002) testeten die Zytotoxizität verschiedener Konzentrationen von DMSO an Caco2/TC7-Zellen und konnten bei der Inkubation der Zellen mit einer 10 %igen DMSO-Lösung über 120 Minuten keine zytotoxischen Effekte feststellen. Bei den verwendeten HEK293-Zellen sollte demnach eine nur 10-minütige Inkubation mit einer 2 %igen DMSO-Lösung auch zu keiner Zytotoxizität führen. Schwer lösliche Substanzen wie z.B. Cholesterol-3-sulfat, Progesteron, DHEA und Dexamethason wurden in Ethanol bzw. Methanol vorgelöst. Zuerst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Transportpuffer bei 37°C inkubiert und dann nach Abziehen des Transportpuffers mit 280 µl Hemmlösung (Transportpuffer mit gelöstem Inhibitor) für 5 min equilibriert, um möglichst vergleichbare Konzentrationsbedingungen für lipophile und hydrophile Substanzen intra- und extrazellulär herzustellen und so Abweichungen bedingt durch unterschiedliche Dissoziationskonstanten auszugleichen. Die Zugabe von 20 µl Messlösung startete die Aufnahme und stellte gleichzeitig die Endkonzentration an unmarkiertem Inhibitor und radioaktiv-markiertem Substrat ein. Direkt nach Zugabe wurde die Zellkulturplatte für 30 s geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der radioaktiven Meßlösung zu garantieren. Die Beendigung des Versuches erfolgte nach Ablauf der Aufnahmezeit wie unter 3.7.2 beschrieben.

3.7.4 Flüssigszintillationsmessung

Nach dem Stoppen der Aufnahmemessung wurden die Zellen über Nacht bei 37°C in 400 µl (24-well Platten) oder 500 µl Lysepuffer (12-well Platten) lysiert. Ein Aliquot des Zelllysats wurde in Minivials überführt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und nach Vortexen der Proben die enthaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter ermittelt.

3.7.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951). Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen an Protein (0–800 µg/ml) mitgeführt. Je 3 x 20 µl Standard oder Probe (Zelllysat) wurden in die Wells einer 96-well Platte pipettiert. Es folgten die Zugabe von 200 µl Lösung C, 15 min Inkubation bei RT und die Zugabe von 40 µl Folinreagenz. Nach zweistündiger Inkubation bei RT war die Farbreaktion abgeschlossen und die Extinktion wurde bei 655 nm im ELISA-Reader bestimmt. Die Extinktionen der Standardreihe ergaben in einer linearen Regression eine Eichgerade, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe diente.

3.7.6 Auswertung der Aufnahmeversuche

Die aufgenommene Substratmenge wurde unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils der radioaktiv-markierten Substanz in der Messlösung und anhand substanzspezifischer Umrechnungsfaktoren in Bezug zur ermittelten Proteinkonzentration gesetzt und meist mit der Einheit pmol/mg Protein angegeben. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse und zur statistischen Auswertung der Affinitäten und Berechnung der IC₅₀-Werte wurde das Programm *GraphPad Prism 4* verwendet. Für inhibitorische Bestimmungen in Prozent wurde die Aufnahme der radioaktiven Substanz in die FlpIn-HEK293 Negativkontrollzellen auf 0 % gesetzt, die Aufnahme des Substrats in die Positivkontrollzellen (ohne Hemmsubstanz, aber mit 2 %igem DMSO-Anteil) minus der Aufnahme der Negativkontrollen auf 100 % gesetzt, so dass bei steigenden Konzentrationen einer inhibierenden Substanz sich der prozentuale Anteil der aufgenommenen Substratmenge verminderte.

3.8 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz wird zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenz unterschieden. Während bei der direkten Immunfluoreszenz das Fluorochrom unmittelbar an den Antikörper gekoppelt ist, werden bei der indirekten Fluoreszenz zwei Antikörper benötigt, ein primärer Antikörper, der mit hoher Affinität an das antigene Epitop des untersuchten Proteins bindet, und ein sekundärer Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und die Fluoreszenz trägt. Dabei ist der Sekundärantikörper gegen die Spezies gerichtet, in welcher der Primärantikörper produziert wurde (Kaninchen bei allen mSoat-Antikörpern). Im Folgenden wird der Versuchsaufbau der angewendeten indirekten Immunfluoreszenz erläutert.

Als Primärantikörper wurden die mSoat-Antikörper E-12: sc-136876 und M-14: sc-136877, beide von der Firma Santa Cruz, und zwei von der Firma Eurogentec generierte Antikörper verwendet (s. Kap. 3.8.1). Der Nachweis der Primärantikörper erfolgte über den Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 488.

3.8.1 Herstellung des mSoat₃₁₇₋₃₃₁- und des mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Antikörpers

Mit der Generierung eines mSoat-Antikörpers wurde die Firma *Eurogentec* (Seraing, Belgien) beauftragt. Die Immunisierung erfolgte gegen zwei C-terminale Epitope des mSoat-Proteins, welche in Abstimmung mit unserem Institut ausgewählt wurden.

Das erste Epitop umfasste die Aminosäuren 317 – 331 (KCRRQHPDCPDVCYE) der mSoat-Sequenz, das zweite Epitop die Aminosäuren 329 – 344 (CYEKQPRETSAFLDKG). Um die Antigenantwort schwacher Antigene zu erhöhen, wurden die synthetischen Peptide am C-Terminus mit KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt und zur Doppelimmunisierung von zwei Kaninchen (mit den Bezeichnungen 1349 und 1350) eingesetzt. Die Überprüfung der Antigenität der Kaninchensera erfolgte mittels indirektem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Analysis) gegen die Peptid-Carrier-Konjugate und demonstrierte für beide Epitope eine stärkere Immunantwort im Serum des Kaninchens 1349 (Abb. 3.1). Deshalb wurde das Antiserum des Kaninchens 1349 zur Herstellung der beiden affinitätsgereinigten Antikörper mSoat₃₁₇₋₃₃₁ und mSoat₃₂₉₋₃₄₄ verwendet. Bei beiden aufgereinigten Antikörpern konnte durch einen weiteren indirekten ELISA eine höhere Reaktivität gegen das Peptid im Vergleich zum Serum und dem sog. *Flow through*, was gleichbedeutend ist mit dem übrig gebliebenen Serum nach weitgehender Entfernung der spezifischen Antikörper durch die Peptidaufreinigung, festgestellt werden. Sowohl die Positivkontrollen der Immunreaktivität des Carrier-Konjugats ohne Peptidkopplung im Serum und *Flow through*, als auch die Negativkontrolle, die nur eine sehr geringe Reaktivität des aufgereinigten Antikörpers gegen das Carrier-Konjugats aufzeigt, deuten auf eine erfolgreiche Herstellung der beiden mSoat-Antikörper hin, deren weitere Validierung in Kap. 4.1.2 und 4.1.4 erfolgt.

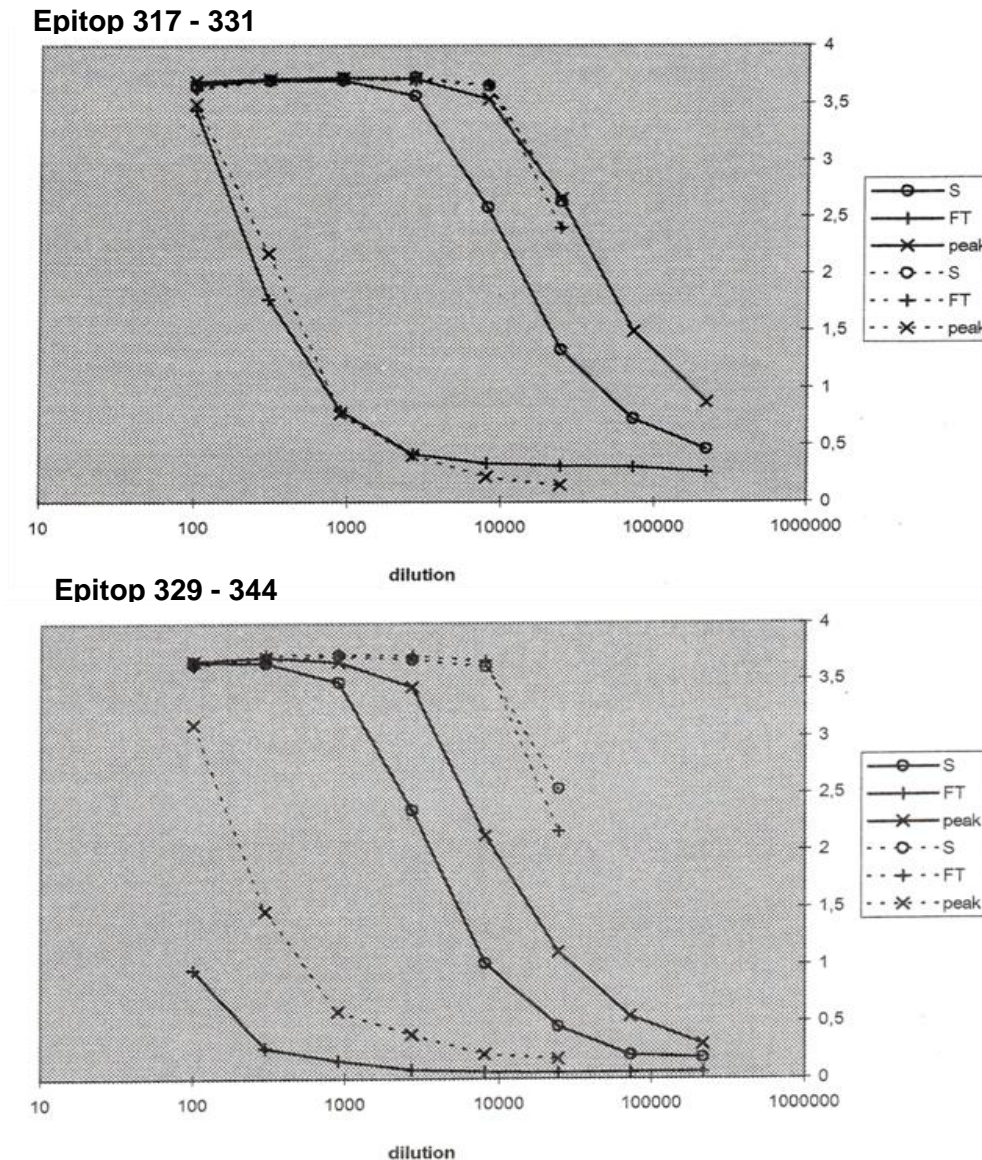


Abb. 3.1: Überprüfung der Antigenität der Peptid-aufgereinigten Antikörper mSoat₃₁₇₋₃₃₁ - und mSoat₃₂₉₋₃₄₄ mittels indirektem ELISA.

Nach Immunisierung des Kaninchens 1349 mit beiden Peptiden (Epitop 317 – 331 und Epitop 329 – 344) wurde das Antiserum nach erwiesener Reaktivität zur Herstellung der polyklonalen Antikörper einer Affinitätsreinigung unterzogen. S = Serum, FT = Flow through (Serum mit stark vermindeter Anzahl von Antikörpern gegen das spezifische Peptid nach Aufreinigung), peak = peptid-aufgereinigter Antikörper. Die durchgehenden Linien repräsentieren die Immunität gegen das Immunisierungspeptid, die gestrichelte Linie die Reaktivität gegenüber KLH.

3.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen mSoat-Antikörpern

Die zu untersuchenden mSoat-HEK293-Zellen mit Tetrazyklininduktion, und als Negativkontrollen mSoat-HEK293-Zellen ohne Tetrazyklininduktion und FlpIn-HEK293-Zellen, wurden in 24-well Platten auf Polylysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und mit oder ohne Tetrazyklin (1 µg/ml) für 48 Stunden bis zu einer Dichte von 60 bis 80 % Konfluenz kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen für 5 min. bei RT mit PBS gewaschen und dann mit 2 % PFA für 15 min bei 4°C fixiert. Generell wurde darauf

geachtet, die Zellen zu keiner Zeit austrocknen zu lassen und vorsichtig zu waschen. Die Fixierung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS (2 x 5 min, RT) beendet und die Zellen für 5 min bei RT mit Puffer A inkubiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte, falls erforderlich, durch Inkubation mit Puffer A + 0,2 % Triton-X 100 für 5 min bei RT. Danach wurden die Zellen für 30 min bei RT in Blockierlösung (Sigma-Blockierlösung 1:10 mit 4 % Ziegenserum) blockiert und mit dem primären polyklonalen Antikörper (mit je zwei Konzentrationen 1:10 und 1:100) in Blockierlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Falls ein Peptid erhältlich war, wurde eine Peptidblockierung für zwei Stunden bei RT mit dem zugehörigen Antikörper mit einem 100-fach molaren Überschuss an Peptid durchgeführt. Außerdem wurden, falls vorhanden, Positivkontrollen mit Antiserum und Negativkontrollen mit Präimmunserum (für beide 1:100 und 1:1000) durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 min wurden die Zellen lichtgeschützt für 1 h bei RT mit dem Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 488 (1:800) in Blockierlösung inkubiert. Auch nachfolgende Schritte fanden im abgedunkelten Raum statt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und dem Anfärben der Zellkerne mit DAPI/Methanol (1:5000) für jeweils 5 min bei RT wurden die Zellen nach Waschen mit Methanol (5 min., RT) getrocknet und die Deckgläschen mit *ProLong Gold Antifade* (Invitrogen) auf Objektträgern eingedekelt.

3.8.3 Mikroskopie

Die Fluoreszenzbilder wurden am *Leica DM5500B* Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Programms *LAS AF6000* mit *3D Deconvolution (DM5500B)* von Leica Microsystems.

3.9 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie beruht auf der Bindung eines spezifischen Primärantikörpers an ein zielgerichtetes Antigen und der nachfolgenden Sichtbarmachung des Proteins im Gewebe. Bei der direkten Immunmarkierung ist der Antikörper direkt mit einem Detektionssystem gekoppelt, welches sichtbar ist oder gemacht werden kann. Dagegen bindet bei der indirekten Immunmarkierung der Primärantikörper an einen Sekundärantikörper, der gegen die Tierart des Primärantikörpers gerichtet sein muss, und seinerseits mit einem Marker gekoppelt, nach seiner Bindung sichtbar gemacht werden kann.

3.9.1 Herstellung histologischer Schnitte

Die Einbettung des Gewebes erfolgte in Paraffin, nachdem das Gewebe für 24 h in 4 % neutral gepuffertem Formalin nach Lillie fixiert wurde. Nach der Fixierung wurden die Proben dreimal für jeweils 12 h in PBS gewaschen und danach über Nacht in 50 %igem Alkohol gegeben und in 70 %igem Alkohol bis zur Einbettung aufbewahrt. Die Hoden- und Harnblasenproben wurden in Dunkelheit für 24 h in Bouin'scher Lösung fixiert, mit 70 %igem Alkohol gespült, und danach mit Hilfe des Einbeters EG 1160 (Leica) in Paraffin eingebettet. Bouin eignet sich besonders zur Darstellung von Zellkernen und Bindegewebe. 5 µm dicke Paraffinschnitte wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms SM2000R (Leica) gewonnen, in ein 50°C warmes Wasserbad gegeben, um auf der Wasseroberfläche eine Streckung zu ermöglichen und danach auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

3.9.2 Immunhistochemische Aufbereitung und Färbung

Das Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte erfolgte für:

- 1) 3x 10 min in Xylol
- 2) 1x 5 min in 100 % Alkohol
- 3) 1x 5 min in 96 % Alkohol
- 4) 1x 5 min in 80 % Alkohol
- 5) 1x 5 min in 70 % Alkohol
- 6) 1x 5 min in Aqua dest.
- 7) 1x 5 min in Tris-Waschpuffer

Zur Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen wurden die Objektträger (OT) in Citratpuffer gestellt, in der Mikrowelle bei 800 W bis zum Kochen des Citratpuffers erhitzt, für 4 weitere min gekocht, dann die Mikrowelle auf 465 W eingestellt und für 15 weitere min erhitzt. Nach einer Abkühlphase von ca. 20 min bei RT wurden die OT für 2x5 min in TRIS-Waschpuffer gewaschen. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase wurden die OT für 30 min auf einem Schüttler mit 3 % H₂O₂ bei RT inkubiert und danach wieder für 2x5 min in Triswaschpuffer gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte in 5 % BSA-Blockpuffer mit Ziegen Serum (1:20) für 30 min bei RT. Die Gewebeschnitte wurden mit dem DAKO-Pen umkreist und der Primärantikörper, das Antiserum oder Präimmunserum in Blockpuffer verdünnt. Falls als Kontrolle eine Peptidblockierung erfolgte, wurde der Primärantikörper für 2 h mit einem 100-fachen molaren Überschuss des zugehörigen Peptids bei RT vorinkubiert.

50 µl des verdünnten Antikörpers, Antiserum etc. wurden auf die Gewebeschnitte pipettiert, bei der internen Negativkontrolle nur der Blockpuffer. Die Inkubation mit dem Primärantikörper

per erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am folgenden Tag wurden die OT 3x5 min mit Tris-Waschpuffer gewaschen, der Sekundärantikörper (Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated E0432 von Dako, Germany) mit dem Blockpuffer verdünnt, 50 µl des verdünnten Sekundärantikörpers auf die Gewebeschnitte pipettiert, für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert und 4x5 min mit Tris-Waschpuffer gewaschen. Nach Herstellerangaben wurde die ABC-Lösung von Vectastain mind. 30 min vor Gebrauch angesetzt, 1-2 Tropfen auf die Gewebeschnitte aufgebracht und für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde wieder 4x5 min mit Tris-Waschpuffer gewaschen. Auch die AEC-Färbelösung (Biologo) wurde nach Herstellerangaben angesetzt, 50 µl der Färbelösung auf die Gewebeschnitte pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die OT für 3x5 min mit Aqua dest gereinigt, für 15 s mit Hämatoxylin gegengefärbt, für 5 min in Leitungswasser gestellt und abschließend mit Aqua dest gereinigt. Das Eindeckeln der OT mit Deckgläschen erfolgte mit erwärmter Glycerin-Gelatine.

3.10 Western Blot

Im Western Blot, auch Immunoblot genannt, werden elektrophoretisch getrennte Proteine mit Antikörpern markiert und durch verschiedene Färbemethoden sichtbar gemacht. Die Proteine werden dazu z.B. mit einem denaturierenden SDS-PAGE-Gel getrennt und dann auf eine Membran aufgeblottet. Die Methode geht auf Edwin Southern, den Erfinder der Blotting Technik, zurück. Der Nachweis des mSoat-Proteins in stabil transfizierten mSoat-HEK293-Zellen erfolgte durch diese Methode.

3.10.1 Proteinaufbereitung

In einer 6-well Platte wurden zwei wells mit 250000 Zellen von mSoat-HEK293-Zellen ausgesät und in einem well die Proteinexpression mit Tetrazyklin induziert; zur Negativkontrolle unterblieb im zweiten well die Tetrazyklininduktion. Nach drei Tagen waren die Zellen konfluent und wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 750 µl PBS mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 1000 g und 4°C pelletiert und zum Zellpellet das 20-fache Volumen (ca. 200 µl) *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* (MBI Fermentas) plus 2 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) gegeben. Nach Resuspension des Pellets durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT auf einem Drehrad. Die Zelltrümmer wurden bei 4°C und 16000 g für 15 min herunter zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen (Zelllysate) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.10.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Zelllysate erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Novagen). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie auch in Anwesenheit zahlreicher chemischer Verbindungen und Detergenzien durchgeführt werden kann. Zunächst wurde eine BSA-Standardreihe in Lysepuffer (*ProteoJET Mammalian Lysis Reagent*) erstellt (0-1000 µg Protein), um einen Einfluss der Pufferbestandteile auf den Assay ausschließen zu können. Die Proteinmessung der Standards erfolgte in Dreifachbestimmung, diejenige der Proben in Doppelbestimmung. In eine 96-well Mikrotiterplatte wurden je 25 µl Standard oder Probe in die Wells pipettiert, pro Probe 200 µl *BCA Solution* und 4 µl 4 % *Cupric Sulfate* gemischt und davon 200 µl in jedes Well gegeben. Auf einem Plattenschüttler erfolgte das Mischen der Proben für 30 s. Die Platte wurde verschlossen, zur Farbentwicklung für 30 min bei 37°C inkubiert und nach Abkühlen der Platte die Farbintensität bei 570 nm im ELISA-Reader bestimmt. Als Leerwert (Blank) diente der Standardwert ohne Protein (0 µg Protein). Über die Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der Zelllysate extrapoliert werden.

3.10.3 Gellauf und Blotting

Je 20 µg Protein der Zelllysate wurden 1:4 mit 4 x Lämmli-Puffer gemischt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Auftrennung und des erfolgreichen Blottens wurden 5 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (MBI Fermentas) aufgetragen, für die exakte Größenbestimmung 5 µl *RotiMark Western Marker* (Roth). Letzterer gibt nach Inkubation der geblotteten Membran mit dem *RotiMark Western Konjugat* (Roth) und *Rotilumin* (Roth) Chemilumineszenzsignale ab, welche direkt auf dem ECL-Film detektiert werden. Die Separierung des Proteingemischs erfolgte in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel über Nacht bei 50 V. Anschließend wurde das Sammelgel entfernt, die *Hybond ECL Nitro-cellulose Membran* (GE Healthcare) sowie sechs Filterpapiere auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und das Gel, die Membran und Filterpapiere für 10 min in Transferlösung inkubiert. Für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde das *semi-dry* Verfahren in einem *PerfectBlue „Semi-Dry“-Elektroblotter* (PeqLab) angewendet und der Blot wie unter Abb. 3.2 gezeigt aufgebaut.

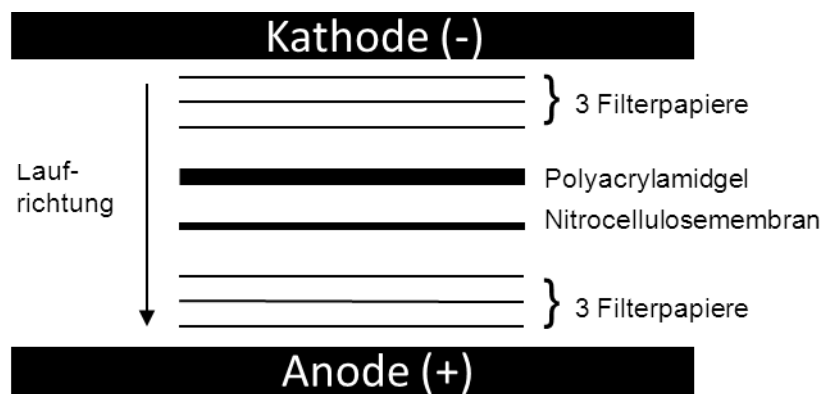


Abb. 3.2: Aufbau des Semi-Dry Elektrobloß Gelsandwiches.

Die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der positiven Anode. Zum Aufsaugen von Puffer und zum Feuchthalten von Gel und Membran werden über dem Gel und unter der Membran drei Lagen Papier positioniert. Gel, Membran und Papierstreifen müssen dieselbe Größe haben.

Um eventuell eingeschlossene Luftblasen zu entfernen wurde vorsichtig mit einem 50 ml Reaktionsgefäß über das Gelsandwich gerollt und anschließend überschüssiger Transferpuffer von der Bodenplatte entfernt. Der Blot erfolgte bei $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 2 h. Der erfolgreiche Transfer der Proteine war an der Übertragung des vorgefärbten Proteinmarkers sichtbar. Eine zusätzliche Kontrolle ergab sich durch die Visualisierung der geblotteten Proteine durch Inkubation der Membran für 5 min in *Ponceau S Solution* (Sigma). Durch Waschen der Membran in TBS-T konnte der Farbstoff wieder von der Membran entfernt werden.

3.10.4 Blockierung der Membran und Antikörperreaktion

Die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine Inkubation von 1 h mit 5 %iger Milchpulver-Blockierlösung abgesättigt. Es folgte ein kurzer Waschschrift in TBS-T und die Inkubation mit dem mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Primärantikörper 1:100 in Blockierlösung für 1 h bei RT. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal kurz und dann zweimal für 15 min in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper cappel IgG anti-Kaninchen (Ziege) (MP Biomedicals) sowie dem *RotiMark Western Konjugat* (Roth) jeweils in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T inkubiert. Es folgten drei kurze und zwei 15-minütige Waschschriffe in TBS-T und die Detektion der immunmarkierten Proteine.

3.10.5 Detektion

Die Visualisierung der immunmarkierten Proteine erfolgte nach der Chemilumineszenz-Methode. Dazu wurden die Detektionsreagenzien *Rotilumin 1 & 2* (Roth) zu gleichen Teilen miteinander gemischt, für eine Minute auf die Membran gegeben und nach Entfernen des

Rotilumins die Membran in eine durchsichtige Folie eingeschweißt, was wichtig ist, um ein Benetzen des ECL-Films mit dem auf der Membran verbliebenen Rotilumin zu vermeiden. In einer Dunkelkammer erfolgte die Exposition der Membran auf einen *Amersham Hyperfilm ECL*-Film (GE Healthcare) in einer Röntgenkassette. Die Umsetzung des Rotilumins (Luminol) durch die Horseradish peroxidase (HRP) des Sekundärantikörpers führt zur Aussendung von Chemilumineszenzsignalen, welche den Film belichten. Nach der Exposition wurde der Film für ca. 3 min im Entwicklerbad *Rodinal B & W Developer* (Agfa) geschwenkt, die Reaktion durch Inkubation in 2 %iger Essigsäure abgestoppt und anschließend die Signale in *Hypam Schnell-fixierer* (Ilford) für ca. 2 min fixiert. Nach Wässern und Trocknen des Films konnten die Signale begutachtet und ausgewertet werden. Je nach Signalstärke wurde die Belichtungszeit verkürzt oder verlängert.

3.11 Dünnschichtchromatographie

Zur Überprüfung der Reinheit der Gallensäuren wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die radioaktiv markierten Substanzen wurden dabei auf 20x20 cm große 60F-254-Dünnschicht-Kieselgelplatten (DC-Platte) (Merck®, Darmstadt) aufgetragen, die mit Bleistift markiert wurde (Abb. 3.3).

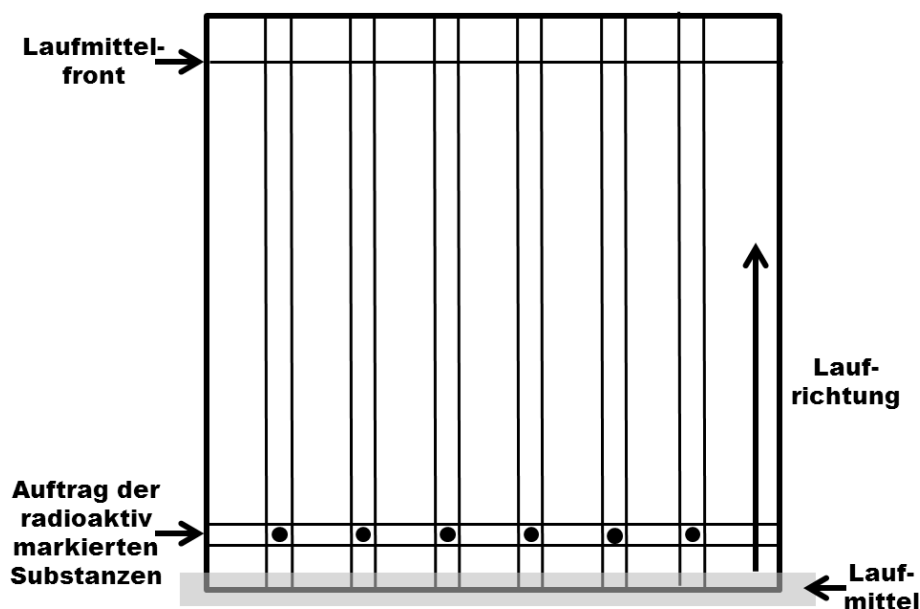


Abb. 3.3: Ansicht einer mit Bleistift markierten 60F-254-Dünnschicht-Kieselgelplatte. Der Auftrag der Tritium-markierten Substanzen auf gleicher Höhe erfolgt punktuell, so dass das Laufmittel die Substanzen in Richtung der Laufmittelfront transportiert und bedingt durch die Hydrophilie/Lipophilie bzw. Polarität der verschiedenen Substanzen bei Unreinheit eine Auftrennung erfolgt bzw. eine unterschiedliche Laufweite zu beobachten ist.

Eine gesättigte Laufmittelatmosphäre wurde dadurch erreicht, dass der Boden eines rechteckigen mit Filterpapier ausgekleideten Glasbehälters mit Laufmittel bedeckt und luftdicht verschlossen wurde. Die mobile Phase bzw. das Laufmittel bestand aus Butanol, Eisessig und Wasser bidest. im Verhältnis 5 / 2 / 3. Nachdem die Laufmittelfront gerade den oberen Rand der DC-Platte erreicht hatte, um auch kleinere Unterschiede zwischen allen getesteten Gallensäuren aufzuzeigen, oder eine bei 19 cm mit Bleistift markierte Linie, wurde die DC-Platte an der Luft getrocknet und mittels eines Isomess-IM-3000-Radio-Dünnschicht-Analysators vermessen, der die ionisierenden Strahlenteilchen über ein Zählrohr, in dem sich ein Methan/Argon-Gemisch befindet, in elektrische Signale überträgt. Dabei spricht ein einzelner angezeigter Radioaktivitätspeak für die Reinheit einer Substanz.

4 ERGEBNISSE

4.1 Funktionelle Charakterisierung des murinen Soat (mSoat)

4.1.1 Sequenzanalyse des murinen Soat

Das Soat-Gen der Maus (mSoat, Slc10a6), Gegenstand des Abschnitts 4.1, ist mit einer Gesamtlänge von 23,6 kb auf Chromosom 5 E5 lokalisiert. Die Nukleotidsequenzen der Exon-Intron Grenzen basieren auf dem GenBank-Eintrag mit der Zugangsnummer NM_029415.2 (mRNA-Sequenz) und dem genomischen Klon unter der Zugangsnummer NC_000071.5. Das aus insgesamt 2124 bp bestehende mRNA *full-length* Transkript des mSoat, mit einem 171 bp langen 5'-UTR und einem 831 bp langen 3'-untranslatierten Bereich, setzt sich, analog zum humanen Soat (SOAT), aus 6 Exonen mit den Längen 548, 119, 89, 173, 158, und 1037 bp zusammen (s. Tab. 4.1). Nach Identifizierung einer SOAT-homologen Sequenz mittels BLAST Suche in einer *mus musculus* cDNA Bibliothek einer embryonalen Lunge (Klon 8430417G17, GenBank-Eintrag AK018423) wurde der murine Soat erstmals im Jahr 2003 an unserem Institut kloniert (Geyer et al. 2004). Das mSoat-Protein (GenBank-Eintrag NP_083691) besteht aus 373 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 40,7 kDa.

Tab. 4.1: Exon/Intron-Organisation des murinen Slc10a6-Gens

Exon	Exonlänge (bp)	5'-Spleiß-Donor	3'-Spleiß-Akzeptor	Intron (kb)
1	548	TCTCAG/gtaagt	ttccag/CATCAG	10.4
2	119	GCATAG/gtctgt	tttttag/GAATTA	0.6
3	89	CTCAAG/gtcagg	gcttag/GTCGGA	5.1
4	173	GCAAAG/gtacag	acccag/GTGCAG	3.2
5	158	TCGCAG/gtgcat	gtccag/CATATC	2.2
6	1037	CCAACC		

Die Sequenzen der Exon-Intron Grenzen sind in den Spalten 5'-Spleiß-Donor und 3'-Spleiß-Akzeptor angegeben, wobei die in Großbuchstaben angegebenen Sequenzen exonischen Sequenzen und kleingeschriebene Buchstaben intronischen Sequenzen entsprechen. Nach den gültigen Konsensussequenzen beginnt jedes Intron mit einem „gt“ und endet mit einem „ag“.

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen von mSoat, Soat der Ratte (rSoat) und SOAT zeigt, bis auf einen divergenten C-Terminus, eine hohe Sequenzidentität aller Sequenzen (Abb. 4.1). SOAT- und mSoat-Protein besitzen eine Sequenzidentität von 71 %; SOAT und rSoat von 70,5 %. mSoat und rSoat weisen die höchste Identität von 90,8 % auf (kalkuliert mit DNASTar MegAlign). Während der humane SOAT drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen aufweist (N⁴, N¹⁴, N¹⁵⁷), zeigen mSoat und rSoat nur zwei mögliche Stellen an Positi-

on 8 und 14. Zahlreiche potenzielle Phosphorylierungsstellen ließen sich mit dem bioinformatischen Programm NetPhos 2.0 für die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin bei allen drei Proteinen finden (s. Abb. 4.1). Ein bei allen Spezies und allen Mitgliedern der SLC10-Familie wiederkehrendes Motiv „ALGMMPL“ konnte nachgewiesen werden (Geyer et al. 2006), ein bei vielen Spezies wiederkehrendes Tandem-Repeat „LTIP“ existiert bei Maus und Ratte jedoch nicht (Döring, Dissertation 2010).

Abb. 4.1: Alignment der Proteinsequenzen von mSoat, rSoat und SOAT

Das Alignment wurde mit dem *ClustalW* Algorithmus berechnet und mit *Boxshade* 3.21 visualisiert. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäuren grau. Mit NetNGlyc 1.0 berechnete potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind in rot, mit NetPhos 2.0 berechnete potenzielle Phosphorylierungsstellen in grün dargestellt. Für ein optimales Alignment wurden Lücken eingefügt (-). Das Signaturmotiv der SLC10 Familie ist rot umrandet, das bei vielen Spezies vorkommende Tandem-Repeat „LTIP“ blau. Hervorgehobene Sterne zeigen die mutmaßlichen vorhergesagten Transmembrandomänen einer überwiegenden Mehrheit der bioinformatischen Programme an (Tab. 4.3). Folgende Sequenzen wurden für das Alignment verwendet: mSoat NP_083691, rSoat NP_932166, SOAT NP_932069.

mSoat	1	MSTDCAGNSTCPVNSTEEDPPVGMEGHANLKLIFTVLSAVMVGLVMFSGFCSVESQKLWL	
rSoat	1	MSADCEGNSTCPANSTEEDPPVGMEGQGSLLKLVFTVLSAVMVGLVMFSGFCSVESRKLWL	
SOAT	1	MRANCSSSSACPANSSEELPVGIEVHGNIELVFTVVSTVMMGLIMFSLGCSVEIRKLWS	
		*****	*****
mSoat	61	HLRRPWGIAVGLLSQFGLMPLTAYLLAIGFGLKPFQAI AVLMMGSCPGGTISNVLTFWVD	
rSoat	61	HLRRPWGIAVGLLCQFGLMPLTAYLLAIGFGLKPFQAI AVLIMGSCPGGTISNVLTFWVD	
SOAT	61	HIRRPWGIAVGLLCQFGLMPLTAYLLAISFSLKPVQAI AVLIMGCCPGGTISNVLTFWVD	
		*****	*****
mSoat	121	GDMDLSISM TTCSTVAALGMMPLCLYIYTRSWTLTONLVIPYQSIGITLVSLVVPVASGV	
rSoat	121	GDMDLSISM TTCSTVAALGMMPLCLYVYTRSWTLTPQSLTIPYQSIGITLVSLVVPVASGI	
SOAT	121	GDMDLSISM TTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQONLTIPYQNI GITLVCLTIPVAFGV	
		**	*****
mSoat	181	YVNYRWPQKQATVILKVGAILGGMLLLVAVTGMVLAKE-WNIDVTLLVISCIFPLVGHVT	
rSoat	181	YVNYRWPQKQATFILKVGAAVGGMLLLVAVTGVVLAKE-WNIDVTLLVISCIFPLVGHVM	
SOAT	181	YVNYRWPQKQSKIILKIGAVVGGVLLLVAVAGVVLAKEGWSNIDITLLTISFIFPLIGHVT	
		*****	*****
mSoat	240	GFLLAFLTHQSWQRCRTISLETGAQNIQLCIAMQLSFSAEYLVQLLNLFALAYGLFQVLH	
rSoat	240	GFLLAFLTHQSWQRCRTISLETGAQNIQLCIAMQLSFSAEYLVQLLNLFALAYGLFQVLH	
SOAT	241	GFLLAFLTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTA EHLVQMLSEFLAYGLFQLID	

mSoat	300	GLLIVAAYQAYKRRQKSKCRRQHPDCPDVCEYEQ---PRETSAFLDKGDEAAVTLGEVQP	
rSoat	300	GLLIVAAYQAYKRRQKSQYRRQHPCCQDISEEQ---PRETSAFLDKGAEAAVTLG---L	
SOAT	301	GFLIVAAYQTYKRRLKNKHGKKNSGCTEVCHTRKSTSSRETNAFLEVNEEGATIPGP PGP	
mSoat	357	EQHHRAAELTSHIPSC	
rSoat	354	EQHHRTAELTSHVPSCE	
SOAT	361	MDCHRALEFPVGHITSCE	

Nach Alignment der Promotorsequenzen von SOAT, mSoat und rSoat wurde eine *in silico* Promotoranalyse durchgeführt. Hierfür wurde mit den bioinformatischen Programmen Genomatix Software GEMS Launcher 5.6, EIDorado 08-2011 und MatInspector 8.0.5 nach bekannten Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren gesucht. Auf dem Minusstrang wurde an Position -318/319 bis -336/337 für Maus und Ratte, und an Position -323 bis -341 für den Menschen eine hoch konservierte Androgenrezeptor (AR)-Bindungsstelle identifiziert. An sel-

biger Position auf dem Plusstrang wurde eine hoch konservierte Glukokortikoidrezeptor (GR)-Bindungsstelle lokalisiert (s. Tab.4.2).

Tab. 4.2: *In silico* Promotoranalyse von SOAT, mSoat und rSoat. Identifizierte hoch konservierte AR- bzw. GR-Bindungsstellen sind grau hinterlegt (Genomatix Software GEMS Launcher 5.6, EIDorado 08-2011 und MatInspector 8.0.5).

Spezies	Position auf dem Minusstrang	Genomische Promotorsequenz
Mensch	-323 bis -341	TTTCAGGGACACAATGTGATGCTG
Maus	-319 bis -337	TTCCCTAGAACACGATGTGCCACTG
Ratte	-318 bis -336	TTCCCTAGAACACGATGTGCCACTG

4.1.2 Membranexpression und -topologie

Eine ausführliche Analyse der Membrantopologie des mSoat mit insgesamt 22 bioinformatischen Programmen, deren Kenntnis entscheidend zur Erstellung eines gegen eine Peptidsequenz des mSoat gerichteten Antikörpers beiträgt, ergab bei einer überwiegenden Mehrheit der Programme die Vorhersage eines extrazellulären N-Terminus mit ca. 30 Aminosäuren und eines C-Terminus mit intrazellulärer Orientierung mit ca. 65 Aminosäuren. Die Programme PRED-TMR2, TMPred, SOSUI und MemBrain sagten eine Membrantopologie des mSoat mit acht Transmembrandomänen (TMD) voraus.

Dagegen bevorzugte die Mehrheit der Programme mit MEMSAT-SVM, MEMSAT3, TMHMM, HMMTOP, PredictProtein, Phobius, Philius, TMMOD und TOPCONS ein Modell mit 9 TMD. In Abb. 4.1 wird die Lokalisation dieser vorhergesagten TMD auf Basis einer größtmöglichen Übereinstimmung durch Sterne angezeigt. PSORT II, TopPred (KD), DAS-TMfilter, MINNOU, SPLIT 4.0, SVMtm errechneten ein 7-TMD Topologiemodell. TopPred (GES) schlägt ein 7- bis 8-TMD, und TMAP ein 6-TMD Modell vor (s. Tab.4.3).

Tab. 4.3: Vergleich der Membrantopologie des murinen Soat nach Voraussage verschiedener bioinformatischer Programme mit Angabe der Orientierung des N- und C-Terminus sowie der Anzahl und Position der Transmembrandomänen (TMD).

		TMD1	TMD2	TMD3	TMD4	TMD5	TMD6	TMD7	TMD8	TMD9
TopPred(GES)	N _{in} /C _{in(ex)}	32-52	72-92		125-145	162-182	196-216	227-247	(263-283)	287-307
TMAP	----	29-53	71-99			159-181	190-218	221-249		275-303
PSORT II	N _{ex} /C _{in}	32-48	76-92		131-147	164-180	199-215	223-239		288-304
MEMSAT-SVM	N _{ex} /C _{in}	33-55	67-89	96-116	122-152	161-183	197-214	222-244	257-273	286-308
PRED-TMR2	----	32-50	68-88	98-119	127-147	165-182	196-216	225-246		288-307
TMHMM	N _{ex} /C _{in}	32-53	65-87	97-119	126-148	158-180	192-214	224-246	266-283	288-310
TMpred	N _{in} /C _{in}	32-51	68-92	94-114	125-148	165-182	196-215	218-246		288-307
TopPred (KD)	N _{in} /C _{ex}	30-50	73-93		130-150	162-182	196-216	223-243		288-308

SOSUI	----	29-51	74-96		130-152	160-182	192-214	224-246	261-283	286-307
HMMTOP	N _{ex} /C _{in}	32-53	66-88	97-118	127-149	158-180	193-215	224-246	257-279	288-307
MEMSAT3	N _{ex} /C _{in}	32-55	66-90	97-117	126-149	160-184	196-220	223-247	257-280	290-314
PredictProtein	N _{ex} /C _{in}	33-50	69-93	98-115	129-148	163-181	197-216	225-242	264-281	286-304
Phobius	N _{ex} /C _{in}	32-53	65-92	98-118	125-148	160-184	196-219	225-246	266-283	289-310
DAS-TMfilter	----	31-49	69-95		134-147	163-179	193-216	223-246		273-305
MemBrain	----	31-50	66-90	93-114	122-152	161-181	195-217	222-247		284-309
Philius	N _{ex} /C _{in}	31-53	65-88	96-119	126-149	161-184	191-216	223-246	260-283	288-310
MINNOU	----	29-50	66-90		126-151	162-191	200-216	222-247		283-307
SPLIT4.0	----	29-52	65-93		131-154	159-182	192-216	223-247		272-306
SVMtm	----	33-49	71-105		133-147	164-178	195-214	225-245		284-305
TMMOD	N _{ex} /C _{in}	33-53	66-91	98-118	125-149	164-184	196-216	223-246	266-286	290-310
TOPCONS	N _{ex} /C _{in}	31-51	68-88	93-113	129-149	162-182	196-216	223-243	268-288	290-310
OCTOPUS	N _{ex} /C _{in}	31-51	77-97	99-119	136-156	171-191	205-225	233-251	268-288	296-316

Eine mögliche Lokalisation von Proteinen kann mit dem Programm PSORT II vorausgesagt werden. Für den murinen Soat wurde die höchste Wahrscheinlichkeit von 60,9 % für eine Lokalisation in der Plasmamembran berechnet, für das endoplasmatische Retikulum nur 17,4 %. Das Vorkommen von mSoat-Protein in Vakuolen (8,7 %), im Golgi Apparat, Mitochondrien oder Nukleus (je 4,3 %) wurde als unwahrscheinlich eingestuft. Durch Immunfluoreszenz konnte eine größtenteils membranständige Expression in mSoat stabil transfizierten HEK293-Zellen (mSoat-HEK293-Zellen) durch den mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Antikörper (Eurogentec) gezeigt werden (Abb. 4.2). Die Peptidsequenz mit den Aminosäuren 329-344, gegen die der Antikörper gerichtet ist, liegt nach Berechnung aller bioinformatischen Programme im C-Terminus (Tab. 4.3). Als Negativkontrollen dienten mSoat-HEK293-Zellen ohne Tetrazyklin-induktion. Zusätzliche Kontrollen wurden durchgeführt mit: (I) Präimmunsereum, (II) Peptidblockierung des Antikörpers mit 100-fach molarem Überschuss an Peptid sowie (III) mit nicht-transfizierten HEK293-Kontrollzellen (FlpIn-HEK293-Zellen). Mit Antiserum behandelte mSoat-HEK293-Zellen dienten als weitere Positivkontrolle. Weitere getestete kommerzielle mSoat-Antikörper (E-12: sc-136876 und M-14: sc-136877, Santa Cruz), und ein weiterer über Eurogentec gewonnener Antikörper (mSoat₃₁₇₋₃₃₁) zeigten kein Immunfluoreszenzsignal. Zusätzlich konnte mittels Western Blot nach Proteinextraktion von Zelllysaten aus induzierten und nicht induzierten mSoat-HEK293-Zellen ein spezifisches Signal nur bei den induzierten Zellen festgestellt werden, welches bei den nicht induzierten als Negativkontrolle nicht zu erkennen war. Dieses deutliche Signal zeigte sich bei einem Molekulargewicht von ca. 48kDa, eventuell eine glykosylierte Form des mSoat Proteins.

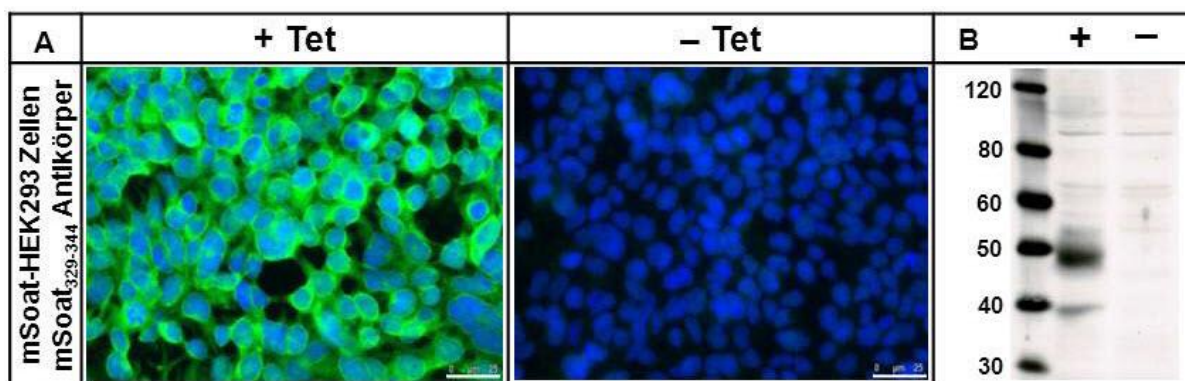


Abb. 4.2: (A) Nachweis der Membranexpression des mSoat-Proteins mittels Immunfluoreszenz. mSoat-HEK293-Zellen, entweder mit Tetrazyklin induziert (+Tet) oder nicht induziert (–Tet) wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Antikörper (1:100) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem sekundären, grün fluoreszierenden Alexa Fluor 488-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen Antikörper (1:800). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Maßstab 25 µM. **(B) Western Blot Analyse** aus Tetrazyklin induzierten (+) und nicht induzierten (–) mSoat-HEK293-Zellen.

4.1.3 Expression des mSoat und des Androgenrezeptors der Maus (mAr)

Zur Validierung der cDNA in der quantitativen RT-PCR und der von Applied Biosystems bezogenen Assays wurden die Standardkurven aller Assays bestimmt. Der R^2 -Wert gibt die Effizienz der cDNA mit dem jeweiligen angewandten Assay an und sollte >0,99 sein. Ein niedrigerer Wert deutet auf Kontaminationen, inhibierende Substanzen, niedrige Primerhybridisierung, zu niedrige Primer- und Sondenkonzentration oder Pipettierfehler hin. Zusätzlich wurde der dynamische Bereich getestet, in welchem akkurate Ergebnisse in der qRT-PCR erhalten werden können, da bei zu hohen oder zu niedrigen cDNA-Konzentrationen keine Gerade sondern eine Kurve gebildet wird und die Ergebnisse der C_t -Werte untereinander nicht mehr vergleichbar sind. Außerdem sollen die getesteten Assays auch untereinander parallel verlaufen.

Die für die qRT-PCR verwendeten murinen Assays Mm00512730_m1 für mSoat, Mm00446968_m1 für Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (mHprt1) und Mm00437762_m1 für Beta-2-Mikroglobulin (mB2m) konnten somit durch eine hohe Effizienz und Parallelität als untereinander vergleichbar validiert werden (Abb. 4.3). mB2m und mHprt1 werden als endogene Kontrolle für die Maus vom Hersteller empfohlen (Life Technologies Application Note 2012).

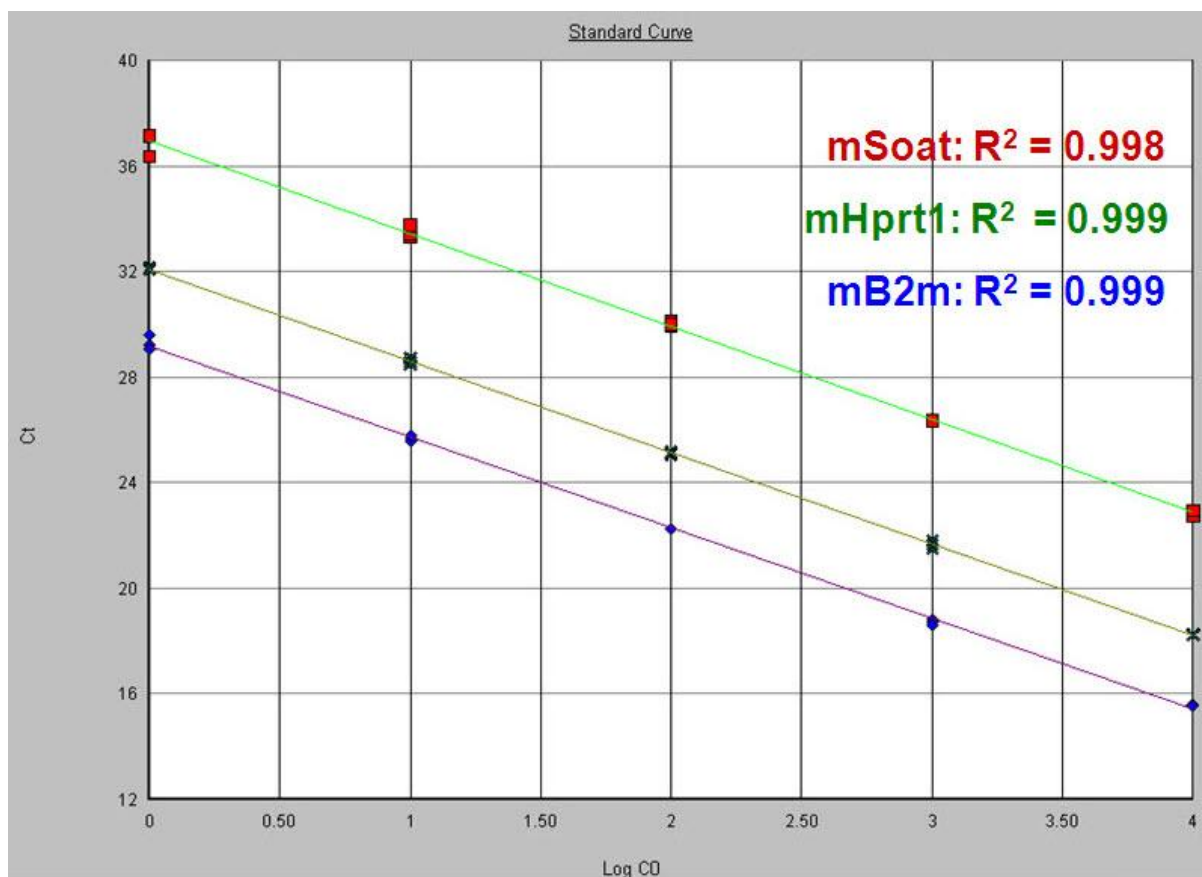


Abb. 4.3: Standardkurve zur Bestimmung der Effizienz (in R^2) und des dynamischen Bereichs der Assays Mm00512730_m1 für mSoat, Mm00446968_m1 für Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (mHprt1) und Mm00437762_m1 für Beta-2-Mikroglobulin (mB2m). Testis cDNA wurde logarithmisch verdünnt (x-Achse) und die C_t -Werte (y-Achse) für alle drei Assays bestimmt.

Die Expression von mSoat wurde in verschiedenen Mausgeweben von je einer männlichen CF-1 (ca. 6 Monate alt), C57BL/6-J (ca. 3 Monate alt) und BALB/c Maus (ca. 6 Monate alt) mit zwei verschiedenen endogenen Kontrollen untersucht (Abb. 4.4). Eine moderate mSoat-Expression wurde in Herz, Harnblase und Haut, die höchste Expression in Hoden und Lunge festgestellt. Die C57BL/6-J Maus zeigte dagegen abweichend eine moderate Expression im Hoden und eine erhöhte Expression in Harnblase und Muskelgewebe. Insgesamt demonstrierten beide Housekeeper mB2m und mHprt1 ähnliche Expressionsprofile, wobei Lunge und Hoden, obwohl bei beiden endogenen Kontrollen am höchsten exprimiert, trotzdem die größte Varianz aufwiesen (s. Kap. 5.1.3).

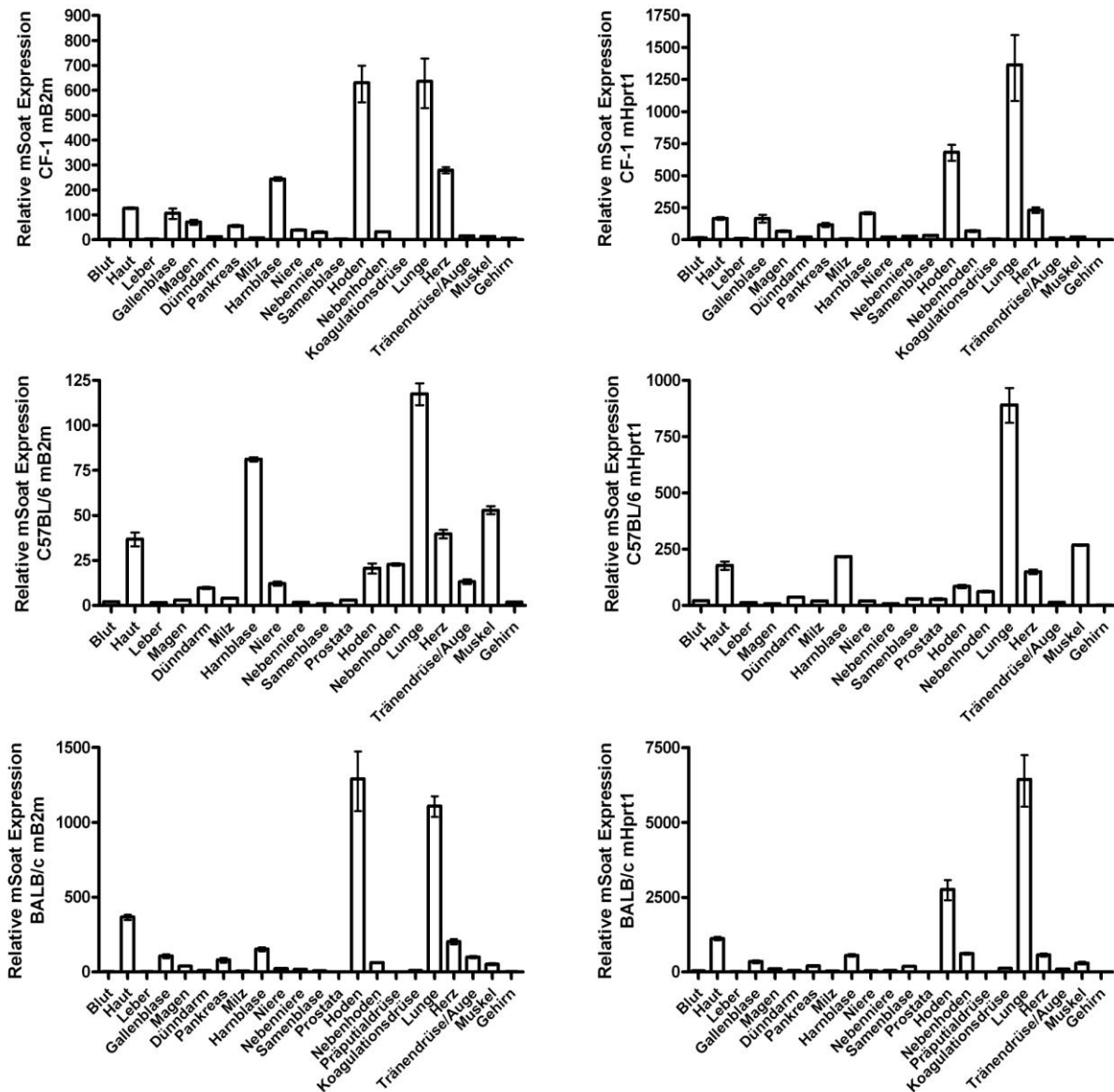


Abb. 4.4: Expressionsprofil von mSoat in murinem Gewebe. Die mSoat-Gewebeexpression wurde von einer CF-1, C57BL/6-J und einer BALB/c Maus mittels qRT-PCR untersucht. Relative mSoat-Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode berechnet und zeigt eine x-fach höhere mSoat-Expression als das Gewebe mit der niedrigsten Expression, welches als Kalibrator gesetzt wurde [Gehirn für alle drei Mäuse mit dem Housekeeper mHprt1 (linke Seite der Abb.), Koagulationsdrüse, Samenblase und Präputialdrüse für die endogene Kontrolle mB2m (rechte Seite, von oben nach unten)]. Die Standardabweichungen stellen den entsprechenden Pipettier- und Messfehler dieses Versuchs dar.

Da zur Rückkreuzung einer geplanten mSoat Knockout-Maus eine Mauslinie als Wildtyp zum Herausfiltern von heterozygoten Tieren benötigt wird, die dann zur Kreuzung von homozygoten Knockout-Mäusen eingesetzt werden, wurde zur Validierung der Ergebnisse der vorangegangenen qRT-PCR in einzelnen Mäusen die Genexpression von mSoat in mehreren CF-1 (n=4), C57BL/6-J (n=5), FVB/N (n=4) und 129Sv (n=3) Mäusen untersucht (Abb. 4.5). Hierbei konnte die niedrige mSoat-Expression im Hoden der C57BL/6-J Maus nicht bestätigt werden. Die scheinbar unterschiedliche Expression von mSoat im Hoden bzw. in der Haut

der 129Sv Maus ist auf eine divergente Expression der jeweiligen endogenen Kontrolle zurückzuführen.

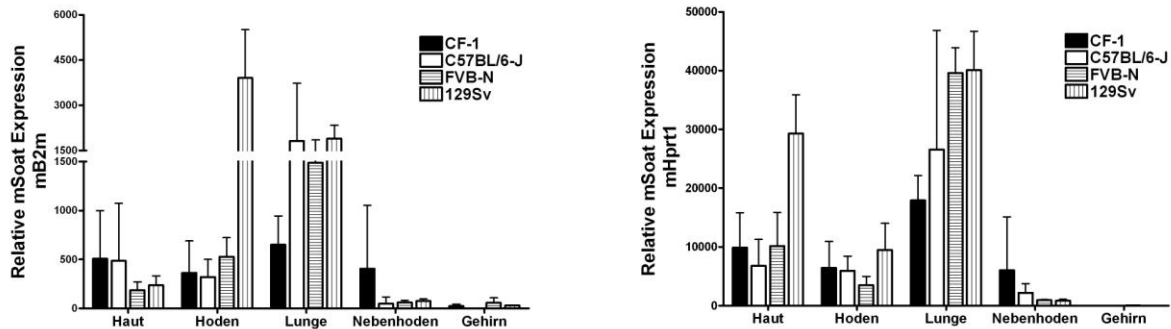


Abb. 4.5: Validierung der mSoat-Expression in Haut, Hoden, Lunge, Nebenhoden und Gehirn von CF-1 (n=4), C57BL/6-J (n=5), FVB/N (n=4) und 129Sv (n=3) Mäusen. Relative mSoat-Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode berechnet und zeigt eine x-fach höhere mSoat-Expression als das Gehirn einer C57BL/6-J Maus, das Gewebe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator). Die Standardabweichungen zeigen die biologische Varianz zwischen den einzelnen Mäusen an.

Zur Spezifizierung der Expression von mSoat in Lunge, Hoden und Blase wurde eine qualitative RT-PCR nach Isolierung einzelner Gewebe durch die *Laser assisted cell picking*-Methode (LACP) und nach reverser Transkription der RNA in cDNA durchgeführt (Abb. 4.6). Die mSoat-Expression konnte so durch spezifische Amplikons für das Bronchialepithel (Abb. 4.6, 3.Spalte), das Alveolarepithel (4), die Tubuli seminiferi (6), den Detrusor (10) und das Urothel (11) bestätigt werden. Keine Expression von mSoat konnte im Interstitium des Hodens nachgewiesen werden.

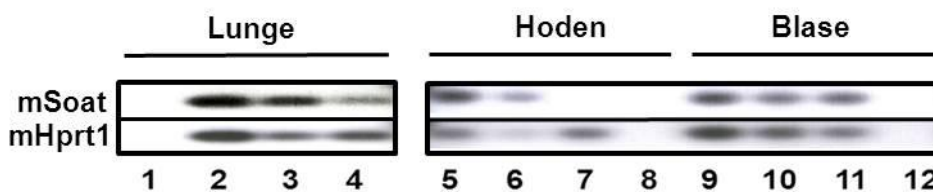


Abb. 4.6: Qualitative RT-PCR von mSoat und mHprt1. Zur Untersuchung isolierter Gewebe wurde die Laser assisted cell picking-Methode (LACP) eingesetzt, extrahierte RNA in cDNA transkribiert und mittels konventioneller PCR mit genspezifischen Primern amplifiziert. 1: Negativkontrolle, 2: Positivkontrolle Lunge, 3: Bronchialepithel, 4: Alveolarepithel, 5: Positivkontrolle Hoden, 6: Tubuli, 7: Interstitium, 8: Negativkontrolle, 9: Positivkontrolle Harnblase, 10: Detrusor, 11: Urothel, und 12: Negativkontrolle. Negativkontrollen wurden ohne cDNA durchgeführt, Positivkontrollen wurden mit cDNA nach Extraktion von vollständigen Mausorganen (ohne LACP) durchgeführt.

Da in der bereits in Kap. 4.1.1 besprochenen *in silico* Promotoranalyse sowohl für mSoat als auch für SOAT eine hoch konservierte AR-Bindungsstelle identifiziert wurde, wurden die Gewebe mit der höchsten Expression von mSoat zusätzlich auf eine mögliche Expression vom Androgenrezeptor der Maus (mAr) hin untersucht (Abb. 4.7). In der Haut wurde das stärkste Signal registriert, gefolgt von einer starken Bande im Hoden. Auch in der Lunge konnte eine moderate Expression von mAr nachgewiesen werden, in der Blase zeichnete sich jedoch nur ein leichtes Signal ab.

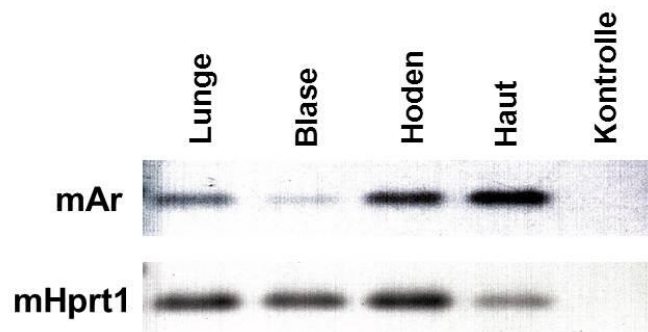


Abb. 4.7: Qualitative RT-PCR von mAr und mHprt1 von Lunge, Harnblase, Hoden und Haut. Negativkontrolle wurde ohne cDNA durchgeführt. mRNA wurde aus den vollständig entnommenen Organen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit genspezifischen Primern mittels konventioneller PCR amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese visualisiert.

4.1.4 Immunhistochemischer Nachweis von mSoat in Geweben

Zur Bestimmung der Lokalisation des mSoat-Proteins wurden immunhistochemische Versuche an verschiedenen in Paraffin eingebetteten Geweben durchgeführt. In immunhistologisch aufbereiteten Schnitten aus dem Hoden einer C57BL/6-J Maus mit dem mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Antikörper (Eurogentec) konnte eine spezifische Anfärbung von pachytänen primären Spermatozyten in der Nähe der Zellkerne nachgewiesen werden (Abb. 4.8, A). In Connexin 43 (SCCx43-) Knockout-Mäusen (Brehm et al. 2007) konnte dieses positive Signal in den Tubuli seminiferi mit einem Arrest der Spermatogenese auf Ebene der primären Spermatozyten in vorhandenen frühen Keimzellen nachgewiesen werden (Abb. 4.8, B), während es in den Tubuli ohne Keimzellen, in denen nur Sertoli (SCO, sertoli cells only) Zellen vorkommen, fehlte (Abb. 4.8, C). In der Lunge zeigte sich eine spezifische Anfärbung des Zytoplasmas von Bronchialepithelzellen der Hauptbronchien bis zu den Bronchioli terminales, nicht aber in den Bronchioli respiratorii (Abb. 4.8, D) und der Lamina propria. In der Haut wurde eine starke Anfärbung der Epidermis festgestellt, das Stratum corneum und die Dermis blieben ungefärbt (Abb. 4.8, E). Die oberflächlichen Deckzellen des Urothels zeigten ein starkes immunhistochemisches Signal, die intermediären und basalen Urothelzellen sowie der Musculus

detrusor vesicae ein moderates, die Lamina propria kein Signal (Abb. 4.8, F). Generell wurden als Negativkontrollen Peptidblockierungen, Inkubation mit Präimmunserum und Inkubation ohne Primärantikörper durchgeführt, die zu einem vollständigen Verlust der Antikörper-spezifischen Färbung führten. Die mSoat-Antikörper E-12: sc-136876 und M-14: sc-136877, beide von der Firma Santa Cruz, und ein weiterer von Eurogentec angefertigter Antikörper mSoat₃₁₇₋₃₃₁ zeigten kein spezifisches immunhistologisches Signal.

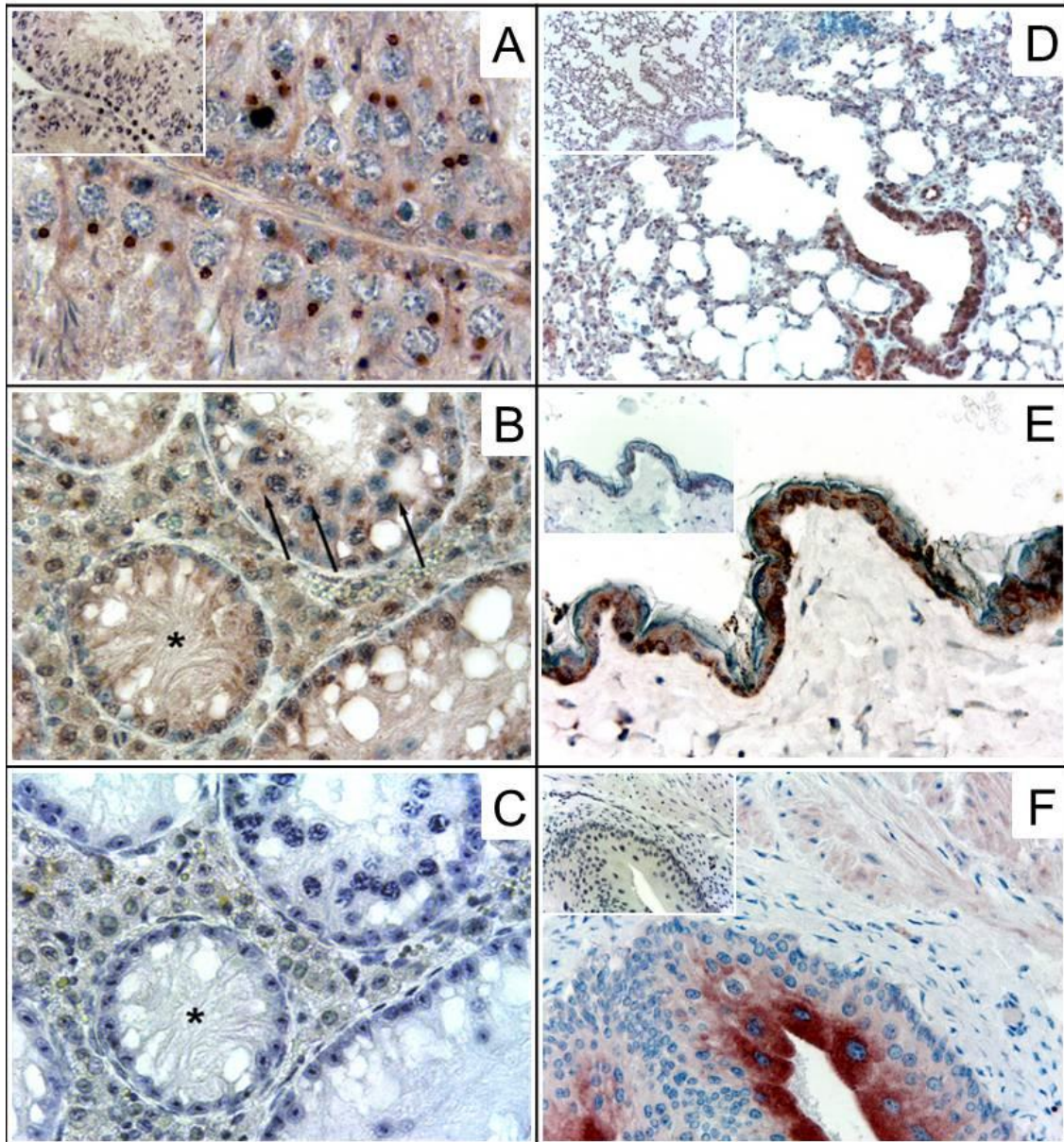


Abb. 4.8: Immunhistochemische Lokalisation des mSoat im Hoden einer C57BL/6-J Maus (A) und einer SCCx43 Knockout Maus (Connexin 43 Knockout-Maus) (B) mit entsprechender Negativkontrolle mit Peptid-blockiertem Antikörper (C). Pfeile zeigen auf das immunhistochemische positive Signal in den primären Spermatozyten, Sterne weisen auf die Tubuli, die nur aus Sertolizellen bestehen, hin. Spezifische immunologische Färbung zeigte sich in der Lunge (D), der Haut (E) und der Blase (F) einer C57BL/6-J Maus. Links in der Ecke sind die jeweils zugehörigen Negativkontrollen mit dem Peptid-blockierten Antikörper dargestellt (~100-fach molarer Überschuss des Peptids). Nach Markierung mit Biotin-Streptavidin und erfolgter Visualisierung durch AEC wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt. Hoden, Lunge, Blase und Haut wurden mit dem mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Antikörper (Eurogentec) (1:100) inkubiert. (A – E: 40x; F: 20x).

4.1.5 Zeit- und Natrium-abhängige Aufnahme von mSoat-Substraten

Da für den humanen SOAT sulfatierte Steroidhormone mit radioaktiver Markierung als Substrat festgestellt werden konnten, wurde auch für den mSoat die Aufnahme von [3 H]DHEAS, [3 H]E₁S und [3 H]PREGS Zeit- und Natrium-abhängig überprüft (Abb. 4.9). Zusätzlich wurde als Negativkontrolle die Aufnahme der Gallensäure [3 H]TC gemessen, die keine Aufnahme für SOAT zeigte. Wie erwartet konnte ein Natrium-abhängiger Transport von sulfatierten Steroidhormonen in stabil transfizierten mSoat-HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Eine statistisch signifikante Aufnahme zeigte sich mit einer Ratio von 3,2 für DHEAS, 2,8 für E₁S und 13,6 für PREGS. TC wurde nicht in die mSoat-HEK293-Zellen aufgenommen. Generell zeigten die mit Natrium-freiem Transportpuffer behandelten mSoat-HEK293- und die FlpIn-HEK293-Zellen ohne mSoat-Expression keine spezifische Aufnahme über eine Zeit von 30 min. Während für DHEAS und E₁S kaum eine Veränderung der Ratio zwischen den 2, 10 und 30 Minuten Werten erfolgt, scheint der Zustand der Sättigung für PREGS erst wesentlich später erreicht zu sein.

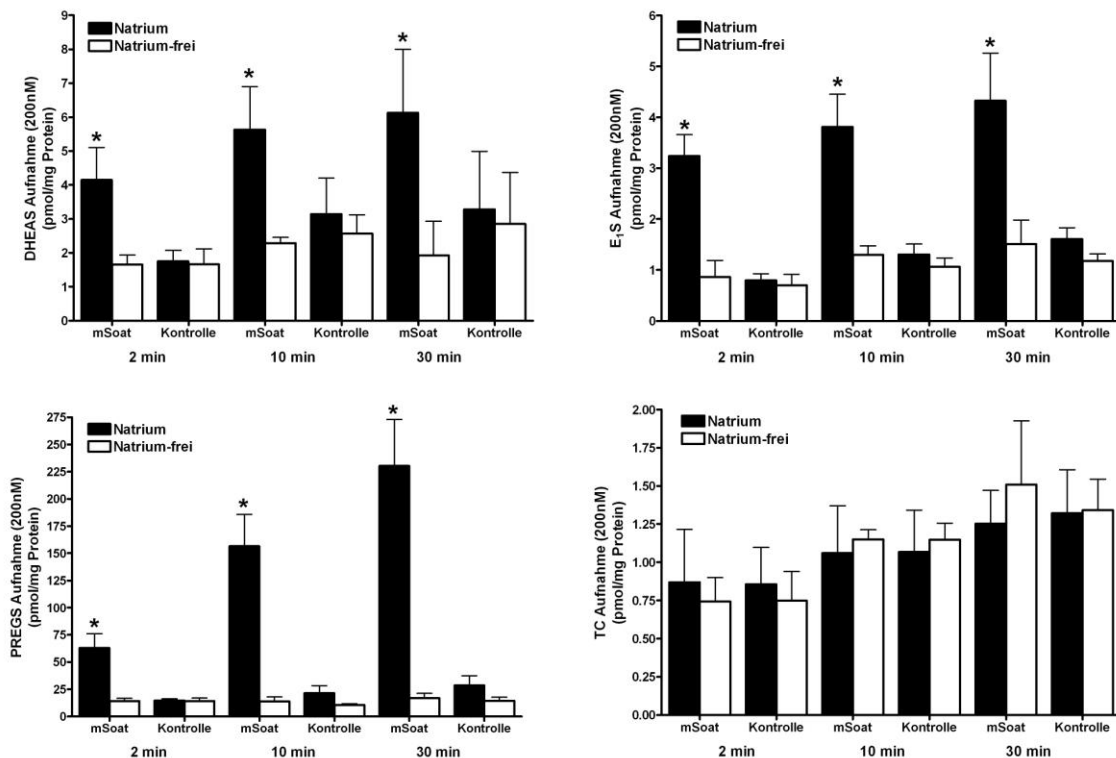


Abb. 4.9: Zeit- und Natrium-abhängige Aufnahme von Steroidsulfaten in mSoat-HEK293-Zellen. Der Transport in mSoat-HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle) wurde mit jeweils 200 nM DHEAS, E₁S, PREGS und TC mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 2, 10 und 30 min gemessen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität bestimmt. Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle, p < 0,001.

4.1.6 Kinetische Bestimmung des mSoat- vermittelten Transportes

Zuerst wurde für das Substrat PREGS die initiale Aufnahmegeschwindigkeit untersucht. Dabei wurde mit den Konzentrationen 20 nM, 200 nM, 2 μ M und 20 μ M zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Sekunden die Aufnahme von PREGS gemessen (Abb. 4.10). Für alle Konzentrationen zeigt sich in den mSoat-HEK293-Zellen eine lineare Aufnahmegeschwindigkeit ohne Anzeichen einer erreichten Sättigung, weshalb die Bestimmung der Kinetiken bei einer Minute erfolgte.

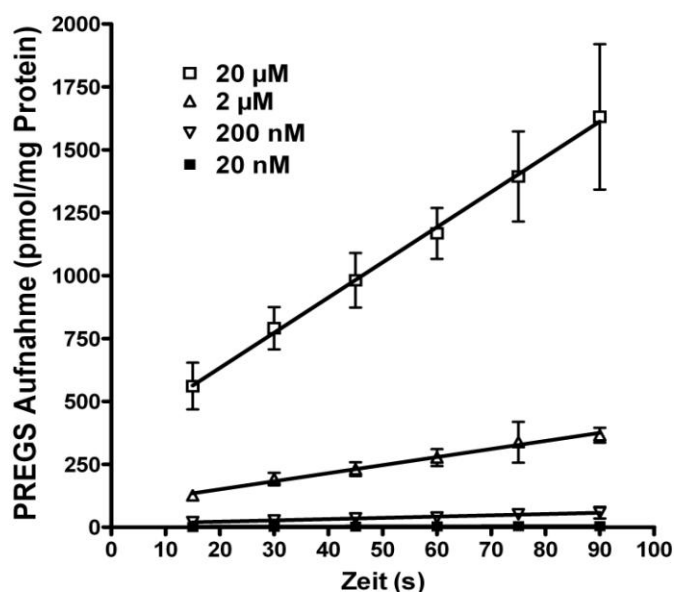


Abb. 4.10: Initiale Aufnahmegeschwindigkeit von PREGS in mSoat-HEK293-Zellen. Für die Expression von mSoat wurden die Zellen mit 1 μ g/ml Tetrazyklin behandelt und die Aufnahme von PREGS zu den angegebenen Zeitpunkten 15, 30, 45, 60 und 90 Sekunden mit den Konzentrationen 20 nM, 200 nM, 2 μ M und 20 μ M bestimmt. Danach wurden die Zellen fünfmal mit eiskaltem PBS gewaschen, lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität mittels Flüssigszintillationscounter bestimmt. Werte repräsentieren MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche (n=6).

Charakteristisch für Michaelis-Menten-Kinetiken zeigten alle Substrate bei ansteigenden Konzentrationen einen Sättigungsverlauf (Abb. 4.11). Die Berechnung der kinetischen Parameter K_m (Michaelis-Menten-Konstante) und V_{max} (maximale Aufnahmegeschwindigkeit) der einzelnen Substrate erfolgte nach nicht-linearer Regressionsanalyse und durch Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Transformation (Tab. 4.4). Während sich bei der Eadie-Hofstee Transformation der K_m -Wert aus der negativen Steigung der Regressionsgeraden ableitet und V_{max} als Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse definiert ist, ist bei der Hanes-Woolf Transformation der Anstieg der Regressionsgeraden als $1/V_{max}$ und der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse als K_m/V_{max} definiert. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse entspricht bei der Lineweaver-Burk Transformation $-1/K_m$, der mit der y-Achse $1/V_{max}$, während V jeweils die Aufnahme bei den entsprechenden Substratkonzentrationen [S] angibt. Die berechneten kinetischen Parameter aller Transformationen geben ein ähnliches Bild ab und bestätigen eine weitgehende Überein-

stimmung der unterschiedlichen Berechnungsmethoden. Zusätzlich wurde eine Transformation der spezifischen Aufnahme nach Hill durchgeführt, wobei sich ein Hill-Koeffizient, der der Steigung der Regressionsgeraden entspricht, für DHEAS mit 0,9, für E₁S mit 1,05 und für PREGS mit 1,02 berechnen ließ. Diese Werte sprechen für eine einzelne Bindungsstelle.

Tab. 4.4: Transportkinetische Parameter von DHEAS, E₁S und PREGS wurden in stabil trans-fizierten mSoat-HEK293-Zellen bestimmt. Kinetische Parameter von K_m (in μM) und V_{\max} (in pmol/mg Protein/min) wurden nach Michaelis-Menten mittels nicht-linearer Regression, Eadie Hofstee, Hanes Woolf und Lineweaver-Burk Transformation ermittelt. Berechnung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 4*.

		DHEAS	E ₁ S	PREGS
Michaelis-Menten Kinetik	K_m	60,3 ± 7,8	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,2
	V_{\max}	362,8 ± 16,9	26,6 ± 1,3	377,3 ± 5,8
Eadie Hofstee Transformation	K_m	29,7 ± 4,9	3,0 ± 0,6	2,9 ± 0,2
	V_{\max}	285,4 ± 27,1	28,7 ± 2,9	390,9 ± 15,3
Hanes-Woolf Transformation	K_m	43,7	3,1	2,6
	V_{\max}	333,0	35,6	377,5
Lineweaver-Burk Transformation	K_m	24,0	3,7	3,2
	V_{\max}	245,1	32,1	407,8

Ähnlich hohe Affinitäten zu mSoat zeigen E₁S und PREGS, jedoch zeigt E₁S als Substrat eine wesentlich geringere Transportkapazität als PREGS. Eine ähnlich hohe Kapazität weist mSoat für DHEAS auf, dafür zeigt es eine ca. 30-fach erniedrigte Affinität (hoher K_m - Wert) im Vergleich zu E₁S oder PREGS. Durch seine hohe Affinität und Transportrate kann PREGS von diesen drei getesteten Substanzen als das Substrat mit der größten Bedeutung für den Soat der Maus angesehen werden.

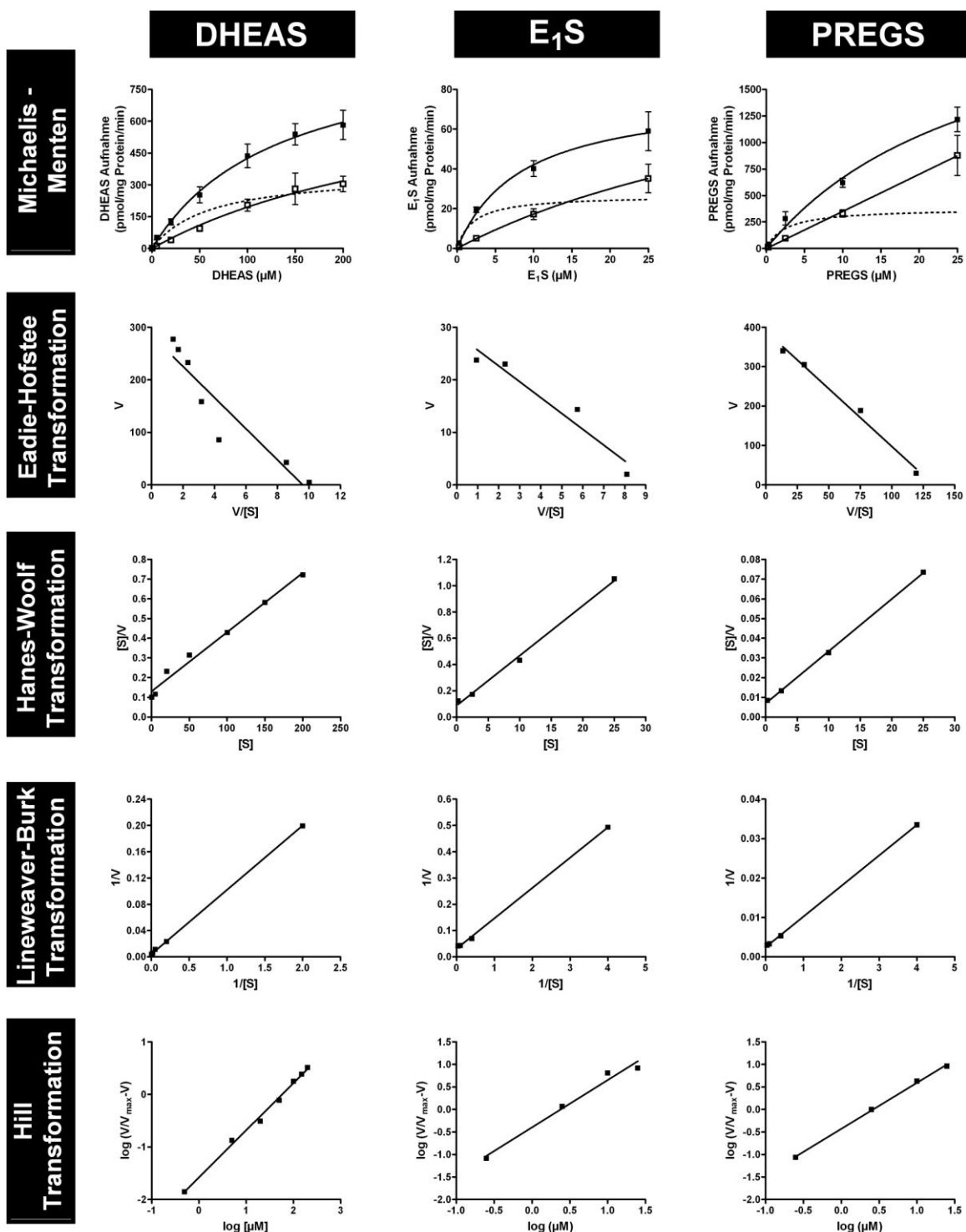


Abb. 4.11: Konzentrationsabhängiger Transport von DHEAS, E₁S und PREGS in mSoat-HEK 293-Zellen. Tetrazyklin-induzierte mSoat-HEK293 (■) und FlpIn-Kontrollzellen (□) wurden für 1 min mit den angegebenen Konzentrationen [³H]DHEAS, [³H]E₁S und [³H]PREGS bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Bei der nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dargestellt. Die SOAT-spezifische Aufnahme (----) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Aufnahme der FlpIn-Kontrollzellen von der Aufnahme in die SOAT-HEK293-Zellen ermittelt. Die Visualisierung der Linearisierungsverfahren der berechneten Kinetiken nach Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Transformationen erfolgte durch *GraphPad Prism 4*, die berechneten Werte finden sich in Tab. 4.4.

4.1.7 *Cis*-Hemmungen des mSoat

Am humanen SOAT wurden bereits verschiedene *cis*-Hemmungen durchgeführt (Döring, Dissertation 2010). Bei einer *cis*-Hemmung, bei der ein Inhibitor auf der gleichen extrazellulären Seite der Zellmembran wie das Substrat zugegeben wird, wird die Fähigkeit nicht-radioaktiv markierter Substanzen untersucht, die Aufnahme eines radioaktiv-markierten Substrats zu inhibieren. Zur Beurteilung eines ähnlich vorliegenden inhibitorischen Musters zwischen SOAT und mSoat wurden mehr als 30 Substanzen getestet. Die inhibitorischen Effekte wurden mit 200 nM [³H]PREGS und einer 100-fachen Konzentration (20 µM) der zu untersuchenden Substanz an stabil transfizierten mSoat-HEK293-Zellen gemessen (Abb. 4.12). Von den xenobiotischen nicht-steroidalen Organosulfaten konnte eine signifikante Beeinträchtigung des PREGS-Transports von mSoat in folgender Reihenfolge festgestellt werden: 4-SMP (4-Sulfooxymethylpyren) > 1Ω-SEP (1-Ω-Sulfooxyethylpyren) > BSP (Bromosulfophthalein) > α-Naphthylsulfat > 4-Methylumbelliferyl-sulfat. Negative Prozentzahlen können dadurch entstehen, dass eine zusätzliche inhibitorische Wirkung auf andere in FlpIn-HEK293 Kontrollzellen exprimierte Transporter von PREGS auftritt. Phenylethylsulfat und Phenylsulfat zeigten keine Inhibition des Transports. Die 3α, 7α, 12α-Trihydroxy-Gallensäuren Cholat und Taurocholat, und die 3α, 7α-dihydroxylierte Gallensäure Chenodeoxycholat zeigten kaum eine Hemmung, die 3α, 12α-dihydroxylierte Gallensäure Glycodeoxycholat dagegen eine Inhibition des Transports von PREGS durch mSoat um ca. 75 %. Die deutlichste Inhibition in der Gruppe der Gallensäuren wurde durch die 3α-Monohydroxy-Gallensäuren Tauroolithocholat sowie Tauroolithocholat-3-sulfat und Lithocholat-3-sulfat erreicht. Bei den Steroiden konnte für Progesteron und Testosteron ein stimulierender Effekt auf den Transport von PREGS durch mSoat nachgewiesen werden. Dieser stimulierende Effekt war jedoch nur im Fall des Progesterons statistisch signifikant. Für Estron, Dexamethason, Dihydrotestosteron und Estradiol konnten weder stimulatorische noch inhibierende Effekte nachgewiesen werden. Die sulfatierten Steroide DHEAS und E₁S, nachgewiesene Substrate von mSoat, zeigten wie erwartet eine Hemmung. Dabei zeigte E₁S eine potentere Inhibition der Aufnahme von PREGS durch mSoat als DHEAS, entsprechend deren unterschiedlichen Affinität im Transport. Bei Estradiol-3,17-disulfat ist nicht bekannt, ob es sich um ein mögliches Substrat von mSoat handelt, eine signifikante Hemmung konnte aber nachgewiesen werden. Estradiol-3-sulfat und Cholesterol-3-sulfat zeigten trotz Sulfatgruppe an Position 3 keine spezifische Hemmung. Die Substanz Flutamid (ein Zytostatikum, das vor allem wegen der inhibierenden Wirkung seines Hauptmetaboliten 2-Hydroxyflutamid auf den AR eingesetzt wird), Tamoxifen (ein selektiver Modulator des ER), Quercitindihydrat, Atropinsulfat, Glutathion, Folsäure, Koffein und Kaffeesäure zeigten keine spezifische Inhibition des mSoat-Transports von PREGS.

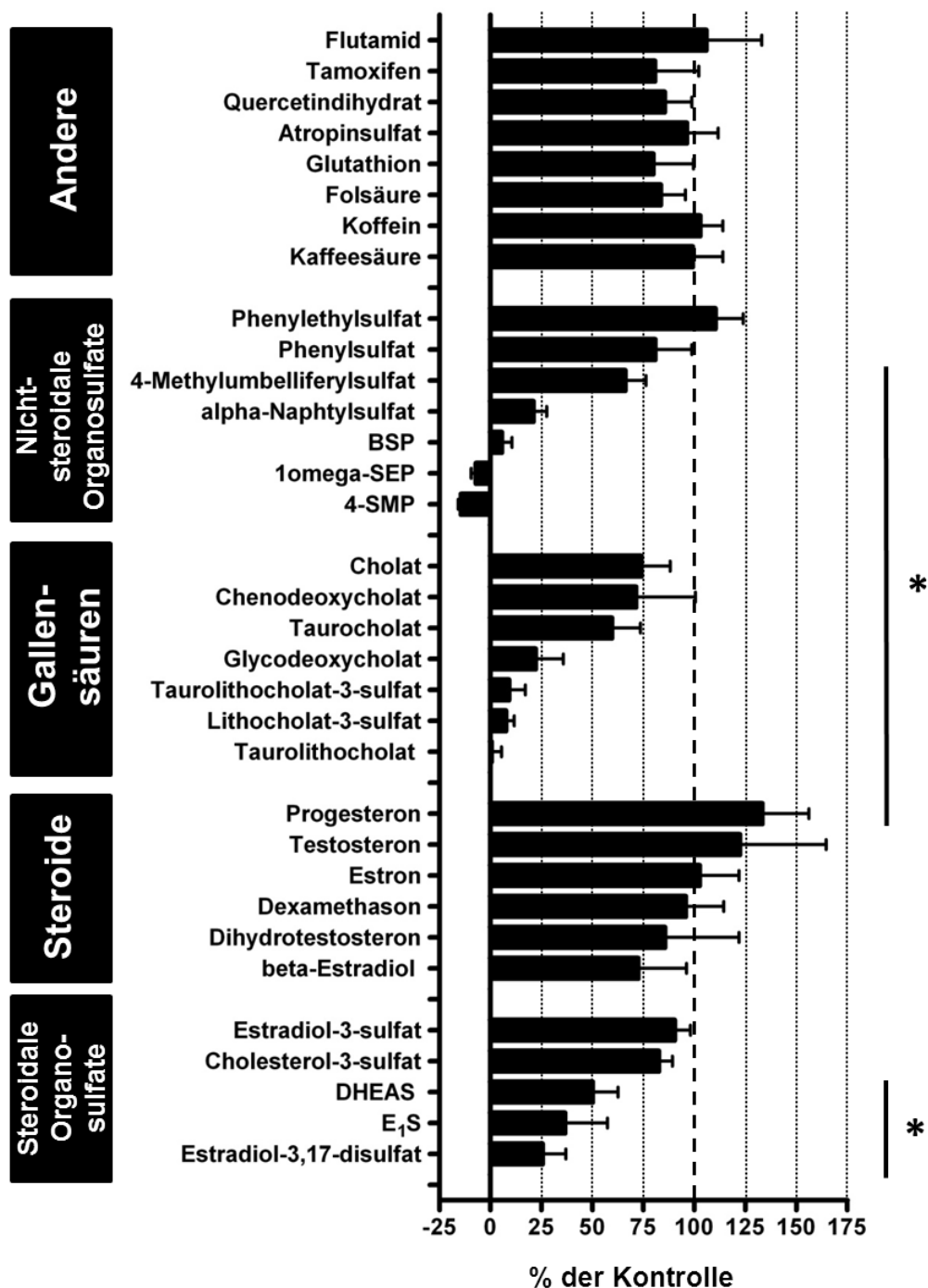


Abb. 4.12: Inhibitorische Wirksamkeit von sulfatierten und freien Steroiden, Gallensäuren, Organosulfaten, u.a. auf den Transport von PREGS in mSoat-HEK293-Zellen. Die Natrium-abhängige Aufnahme von 200 nM [³H]PREGS wurde in Gegenwart von 20 µM der angezeigten Substanz gemessen. Inhibitorische Experimente wurden durch eine 5 minütige Präinkubation der betreffenden Substanz von mSoat-HEK293-Zellen bei 37°C gestartet. [³H]PREGS wurde hinzugefügt und nach weiteren 5 min Inkubation der Versuch durch fünfmaliges Waschen in eiskaltem PBS beendet. mSoat-HEK293-Zellen ohne Inhibitor dienen als Positivkontrolle (Aufnahme wurde auf 100 % gesetzt), die Aufnahme von [³H]PREGS in FlpIn HEK293-Zellen als Negativkontrolle (Aufnahme wurde auf 0 % gesetzt). Repräsentierte Balken zeigen die prozentuale Aufnahme von [³H]PREGS als MW ± SD in Gegenwart des entsprechenden Inhibitors an. * Werte zeigen eine signifikante Veränderung mit $p < 0,05$ an (one-way analysis of variance mit Dunnett *post hoc* Test).

Zusätzlich wurden weitere Substanzen auf ihre Hemmung der Aufnahme von PREGS durch mSoat untersucht, die als „*training set*“ (s. Kap. 4.4.5 und Abb. 4.44) für die Erstellung der 3D-QSAR cAsbt-Pharmakophore (cAsbt = Asbt des Kaninchens) verwendet wurden. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit die IC_{50} -Werte dieser Substanzen für den humanen SOAT bestimmt wurden, wurde auch für den mSoat ein Inhibitionsprofil erstellt, um etwaige Unterschiede zwischen mSoat und SOAT zu analysieren. Abb. 4.13 zeigt, dass die Substanzen S 1647, S 3068, S 3740, S 1690, S 0960 und S 9086 eine signifikante Hemmung herbeiführen, während S 0925 eine signifikante Stimulation der Aufnahme von PREGS durch mSoat bewirkt.

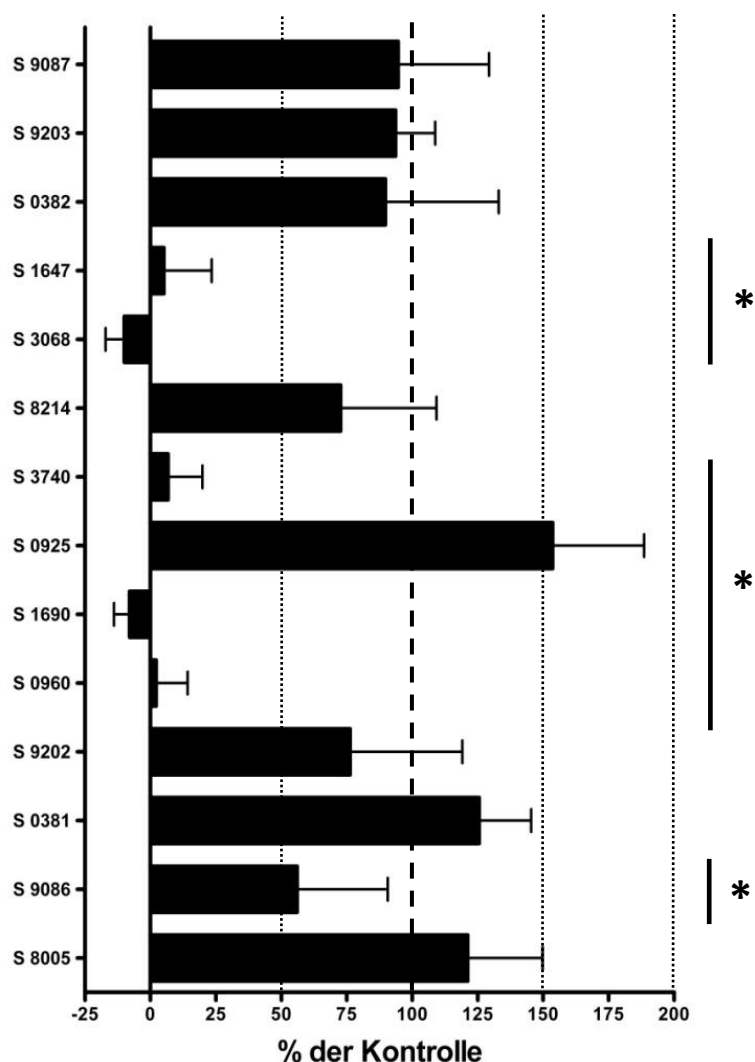


Abb. 4.13: Hemmung des PREGS-Transportes in mSoat-HEK293-Zellen durch chemische Strukturen, die als *training set* für die Erstellung der 3D-QSAR cAsbt-Pharmakophore verwendet wurden. Versuchsaufbau und Durchführung s. Abb. 4.12. Repräsentierte Balken zeigen die prozentuale Aufnahme von $[^3H]$ PREGS als $MW \pm SD$ in Gegenwart des entsprechenden Inhibitors an. * Werte zeigen eine signifikante Veränderung mit $p < 0,05$ an (one-way analysis of variance mit Dunnett *post hoc* Test).

4.2 Der Soat des Schweins (susSoat)

Bisher wurde bereits der SOAT/Soat des Menschen, der Ratte und der Maus auf Grundlage sog. *Expressed Sequence Tags* (ESTs) sowie deren hypothetischen Leserahmen nach einer Megablast-Analyse der Sequenzen von bereits bekannten Transportern der SLC10-Familie, dem NTCP und ASBT, kloniert (Geyer, Dissertation 2004). Für den Soat des Schweins (susSoat) waren im Jahr 2009 keine Sequenzdaten erhältlich. Da jedoch im Eber, im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetieren (Eiler und Graves 1977, Overpeck et al. 1978, Melnyk et al. 1992, Bujan et al. 1993), große Mengen an freien und konjugierten Estrogenen, vor allem E₁S als nachgewiesenes Substrat des Soat/SOAT, im Blut zirkulieren (Claus und Hoffmann 1980), könnte eine Untersuchung vom Soat des Schweins zur Aufklärung der physiologischen Rolle des humanen SOAT beitragen.

4.2.1 Sequenzbestimmung des susSoat

Da keine Sequenzdaten des Schweins vorhanden waren, aber für eine RACE-PCR ein kurzer Sequenzabschnitt bekannt sein muss, wurde RNA aus dem Hoden eines 250 Tage alten Schweins extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe verschiedener Primer des humanen SOAT in möglichst homologen Bereichen verschiedener Spezies konnte aus dieser cDNA mittels RT-PCR ein PCR-Produkt amplifiziert und sequenziert werden. Ausgehend von dieser Sequenz wurden genspezifische Primer für die RACE-PCR ausgewählt. Während durch die 3'-RACE-PCR ein PCR-Produkt amplifiziert und in den pCR4TOPO-Vektor kloniert werden konnte, konnte dieses Ziel durch die 5'-RACE-PCR nicht erreicht werden. Durch die 3'-RACE-PCR konnte die Sequenz von einem Teil des Exon 2, der gesamten Exone 3 bis 6 sowie des 127 bp langen 3'-UTR bestimmt werden. Die für die qRT-PCR benötigten Primer und Sonden wurden an Hand dieser Sequenz ausgesucht. Das Genom des Schweins wurde mittlerweile sequenziert und veröffentlicht. Mittels BLAST-Suche der durch die RACE-PCR erhaltenen susSoat-Sequenz konnte dadurch auf Chromosom 8 (NW_003610973.1, Sscrofa10.2) die entsprechende Sequenz auf einer Gesamtlänge von 25 kb lokalisiert werden. Analog zum humanen SOAT setzt sich der susSoat aus 6 Exonen mit den Längen 377, 119, 89, 176, 158, und 309 bp zusammen (Tab. 4.5). Das susSoat-Protein besteht aus 366 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 39,8 kDa.

Tab. 4.5: Exon/Intron-Organisation des Slc10a6 des Schweins

Exon	Exonlänge (bp)	5'-Spleiß-Donor	3'-Spleiß-Akzeptor	Intron (kb)
1	377	CCTCAG/gtacgt	tttcag/CATCAG	13.6
2	119	ACATGG/gtctgt	cctcag/GAATCA	1.9
3	89	CTCAAG/gtaagc	cctgag/GCTGGG	3.1
4	176	GCAGAG/gtacag	tggag/GTGCAG	3.8
5	158	TTGCCG/gtaggt	acccag/CGTATA	1.4
6	309	CGGGAA		

Die Sequenzen der Exon-Intron Grenzen sind in den Spalten 5'-Spleiß-Donor und 3'-Spleiß-Donor angegeben, wobei die in Großbuchstaben angegebenen Sequenzen exonischen Sequenzen und kleingeschriebene Buchstaben intronischen Sequenzen entsprechen. Entsprechend den gültigen Konsensussequenzen beginnt jedes Intron mit einem „gt“ und endet mit einem „ag“.

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen des Soat/SOAT von Mensch, Hund, Pferd, Rind, Maus und Ratte zeigt im Vergleich zum Schwein eine hohe Sequenzidentität aller Sequenzen (Abb. 4.14). SOAT- und susSoat-Protein besitzen eine Sequenzidentität von 82,2 %, die höchste Identität zum susSoat weist Soat des Pferds mit 84,4 % auf (kalkuliert mit DNASTar MegAlign). Der C-terminale Bereich beim susSoat ist im Vergleich zum Mensch und den Tierarten um ca. 11 Aminosäuren verkürzt.

Abb. 4.14: Alignment der Proteinsequenzen des SOAT/Soat von Mensch, Hund, Pferd, Rind, Schwein, Maus und Ratte.

Das Alignment wurde mit dem *ClustalW* Algorithmus berechnet und mit *Boxshade 3.21* visualisiert. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäuren grau. Folgende GenBank-Sequenzen wurden für das Alignment verwendet: Human: NP_932069, Hund: XP_851303, Pferd: NP_001157440, Rind: ABM68134, Schwein: durch die RACE-PCR erhaltene Sequenz nach Alignment mit der genomischen Sequenz NW_003610973, Maus: NP_083691.1, Ratte: NP_932166

Mensch	1	MRANCSS-S-SACPANSSEEEELPVGLEVHG--NLELVFTVVSTVMMGLLMFSLGCSVEIR
Hund	1	MRANCSS-S-SACPVNSSEEEELPVGPVEVQG--NLEVFTVVSSVMMGLLMFSLGCSVDER
Pferd	1	MRANCSS-S-SACPANSSEEEELPVGLEAHG--NLELVFTVVSAVMMGLLMFSLGCSVEIR
Rind	1	MRANCS--SGLACPANSSEEEELPEGLKAFG--NLDLVFTVVSAIMGLLMFSLGCSVEVQ
Schwein	1	MRANCSG-S-SACLANRSEEEELPVGLEAYG--NLELVFTVVSAVMGLLMFSLGCSVEIR
Maus	1	MSTDCAGNS--TCPVNSTEEDPPVGME--GHANLKLIFTVL SAVMVGLVMFSFGCSVESQ
Ratte	1	MSADCEGNS--TCPANSTEEDPPVGME--GQSLKLVFTVL SAVMVGLVMFSFGCSVESR
Mensch	57	KLWSHIRRPWGIAVGLLCQFGLMPETAYLLAISFSLKPVQAI AVLIMGCCPGGTISNIFT
Hund	57	KLWAHIKRPWGIAVGLLCQFGLMPLTAYLLAISFSLKPAQAI AVLIMGCCPGGTISNIFT
Pferd	57	KLWLHIRRPWGIAVGLLCQFGLMPLIAYLLVICFSLKPVQAI AVLIMGCCPGGTISNIFT
Rind	57	KLWGHIRRPWGIAVGMLCQFGLMPLIAYLLIISFSLKPLQAI AVLIMGCCPGGTISNIFT
Schwein	57	KLWLHIRRPWGIAVGLLCQFGLMPLIAYLLVKSFSLKPVHAAVAVLIMGCCPGGTISNIFT
Maus	57	KLWLHLRRPWGIAVGLLSQFGLMPLTAYLLAIGFGLKPFQAI AVLMMGSCPGGTISNVLT
Ratte	57	KLWLHLRRPWGIAVGLLCQFGLMPLTAYLLAIGFGLKPFQAI AVLIMGSCPGGTISNVLT
Mensch	117	FWVDGMDLSISM TTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQNL TIPYQNIGITLVCLTIPV
Hund	117	FWVDGMDLSIITMTTCSTVAALGMMPLCLYLYTFSWNLEQNL TIPYQNIGITLVCLTIPV
Pferd	117	FWVDGMDLSISM TTCSTVAALGMIPLCLYLYTFSWNLEQNL TIPYQNIGITLVCLTIPV
Rind	117	FWVDGMDLSISM TTCSTMAALGMMPLCLYLYTFSWNLEQNL TIPYQNIGITLVCLTIPV
Schwein	117	FWVDGMDLSISM TTCSTVAALGMMPLCLYLYTFSWNLEQRLTIPYQNMGITLVCLTIPV
Maus	117	FWVDGMDLSISM TTCSTVAALGMMPLCLYTYTRSWTLTONLVIPYQSIGITLVSLVVPV
Ratte	117	FWVDGMDLSISM TTCSTVAALGMMPLCLYVYTRSWTLTPQSLTIPYQSIGITLVSLVVPV

Mensch	177	AFGVYVNYRWPKQSKIILKIGAVVGGVLL	LVVAVAGVVLAKG	SWNSDITLLTISFIFP
Hund	177	AFGIYVNYRWPKQSKIILKIGAVVGGVLL	LVVAVAGVVLAKG	SWNSDITLLTISFIFP
Pferd	177	AFGVYVNYRWPKQSKIILKIGAVVGGVLL	LVVAVAGVVLAKG	SSNLDITLLTISFIFP
Rind	177	AFGIYVNYRWPKQSKIILKIGAVVGGVLL	LVVAVAGVVLAKG	FWNSDITLLTISFIFP
Schwein	177	AFGICVNYKWPQSKIILKAGAVVGGVLL	LVVEVAGAVLA	EGSWSSDGVLLTISFIFP
Maus	177	ASGVYVNYRWPKQATVILKVGAILGGMLL	LVVAVTGMVLAKG	WNTDVTLLVISCIFP
Ratte	177	ASGIYVNYRWPKQATFILKVGAAVGGMLL	LVVAVTGMVLAKG	WNTDVTLLVISCIFP

Mensch	235	LIGHVTGFLALFTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTAHLVQMLSFPLAYG
Hund	235	LIGHVAGFLALLTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTAKQLVQMLSFPLAYG
Pferd	235	LIGHVTGFLALLTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTARELVQMLSFPLAYG
Rind	235	LIGHATGFLALLTHQSWQRCRTISLETGTQNVQMCITMLQLSFTAQLVQIFGFVPLAYG
Schwein	235	LIGHVTGFLALLAHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTAQLVQVLSFPLAYG
Maus	234	LVGHVTGFLAFLTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTAQLVQVLSFPLAYG
Ratte	234	LVGHVVMGFLAFLTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTAQLVQVLSFPLAYG

Mensch	295	LFQLIDGFLIVAAYQTYKRRLKNNK	---	HGKKNSGC	--	TEVCHTRKSTSSR	ETNAFLEV
Hund	295	LFQLLDGFLIVAAYKMYKKRLKNE	---	HRKRDTGC	--	AECHKKKS	SSPKETGAFLEL
Pferd	295	LFQLLDGFLITAAAYKMYKRRMKS	---	HRKKKPGC	--	AEACHKKKST	SPKETSAFLEV
Rind	295	LFQMLNGFFMVAAYKMYKRRLKNNK	---	HGNEKPSQEAR	--	HRKKST	SPKETTAFLV
Schwein	295	LFQLLDGFLIVAAYKMYKRSKLNK	---	HSSRSPGC	--	ADTCHEKRST	CPAETGAFLEV
Maus	294	LFQVLHGLLIVAAYQAYKRRQKSKRRQH	---	PDCP	--	DVCYEK	QPRETSAFLDK
Ratte	294	LFQVLHGLLIVAAYQAYKRRQKSKYRRQH	---	PECQ	--	DISSEK	QPRETSAFLDK

Mensch	348	NEEGAITPGPPGPMDCCHRALEPVGHITSCE				
Hund	348	NEEVAITPGPSVAVDLHTALEPSSHITSCT				
Pferd	348	NEEAATPGPSGPVELHMACEPTSHMSSCA				
Rind	348	NEEATLSPGPSGPVDPHGAPTPTGDIARAK				
Schwein	348	NEEAALTPGPAGPWIS	-----	T	-----	RL
Maus	344	GDEAAVTLGVPVQPEQHHRAELTSHIPSC				
Ratte	344	GAEAAVTLG	---	LEQHHRTAELTSHVPSCE		

4.2.2 Quantitative Bestimmung des Soat im Hoden des Schweins

Als endogene Kontrollen in der qRT-PCR wurden die in der Literatur bereits beim Schwein validierten Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (susHprt1) und das TATA-Box-Bindprotein (susTbp) verwendet (Nygard et al. 2007, Duvigneau et al. 2005). Wie in Kap. 4.1.3 beschrieben, erfolgte auch für die speziell auf Wunsch durch Applied Biosystems angefertigten Primer und Sonden von susSoat, susHprt1 und susTbp eine Validierung mittels Bestimmung einer Standardkurve (Abb. 4.15). Der hohe R^2 -Wert von über 0,99 zeigt eine hohe Effizienz der getesteten Assays bei der cDNA des Schweinehodens. Bei logarithmischer Verdünnung der cDNA stellt sich heraus, dass die ermittelten Geraden von susSoat und susHprt1 wie erforderlich fast parallel verlaufen, während bei susTbp zu susSoat innerhalb von fünf Zehnerpotenzen ein Unterschied von mehr als einem C_t -Wert auftritt. Da ein Unter-

schied von einem C_t -Wert bei Berechnung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode potenziert wird, ist Hprt1 als endogene Kontrolle für den susSoat besser geeignet.

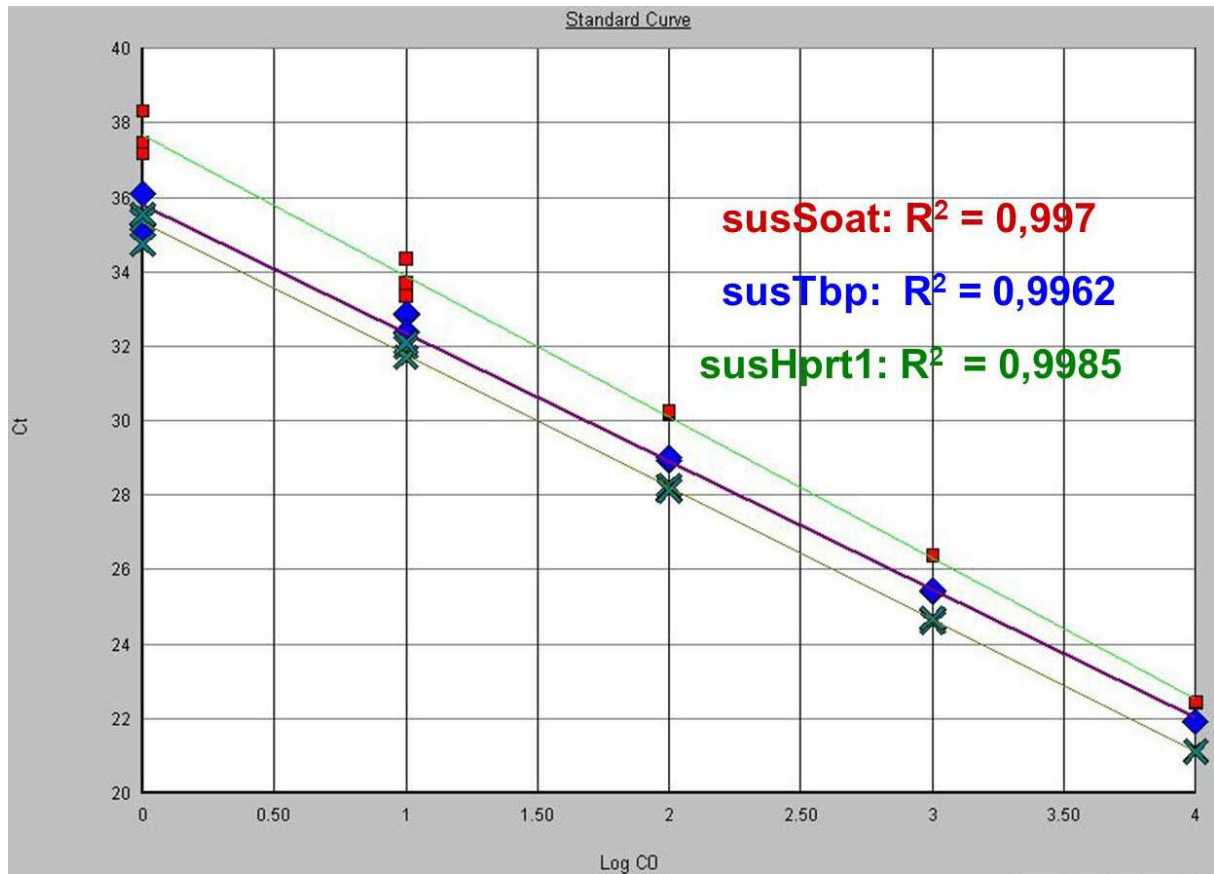


Abb. 4.15: Standardkurve zur Bestimmung der Effizienz (in R^2) und des dynamischen Bereichs der Assays von susSoat, susTbp und susHprt1. Testis cDNA eines 250 Tage alten Schweins wurde logarithmisch verdünnt (x-Achse) und die C_t -Werte (y-Achse) für alle drei Assays bestimmt.

Beim Eber tritt die Geschlechtsreife zwischen dem 150. und 240. Tag ein. Um eventuelle präpubertäre bzw. pubertäre Unterschiede in der Expression des Soat aufzuzeigen, wurde RNA aus dem Hoden eines 50 und eines 250 Tage alten Schweins isoliert und in cDNA umgeschrieben. Auf mRNA-Ebene konnte mit susHprt1 als endogene Kontrolle eine 465-fach höhere Expression des susSoat beim 250 Tage alten gegenüber dem 50 Tage alten Schwein festgestellt werden, mit susTbp als endogene Kontrolle eine 224-fache Erhöhung der Expression (Abb. 4.16).

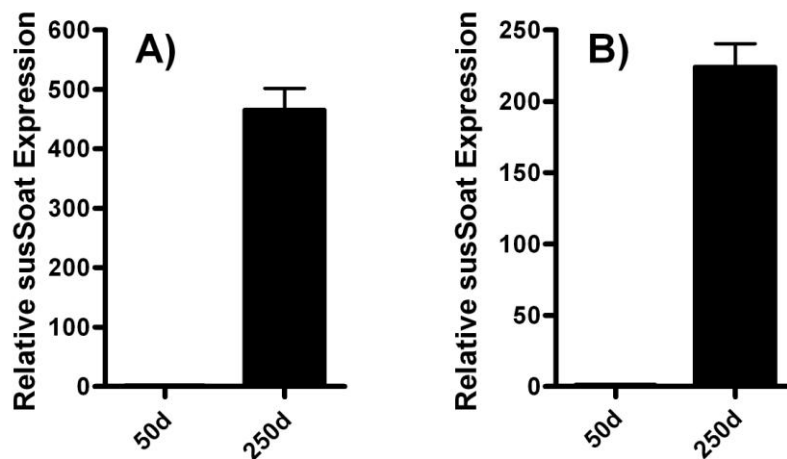


Abb. 4.16: Expression von *susSoat* im Hoden eines 50 und eines 250 Tage alten Schweins mit *susHprt1* (A) bzw. *susTbp* (B) als endogene Kontrolle. Die *susSoat*-Gewebeexpression wurde mittels qRT-PCR untersucht; die relative *susSoat*-Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode berechnet und zeigt eine 465 bzw. 224-fach höhere *susSoat*-Expression im Hoden des 250 Tage (d) alten Schweins gegenüber dem Kalibrator, dem 50 Tage (d) alten Schwein, an. Die Standardabweichungen stellen den entsprechenden Pipettier- und Messfehler dieses Versuchs dar.

4.3 Substratvergleich der SLC10-Carrier NTCP, ASBT und SOAT

Trotz ihrer engen phylogenetischen Beziehung mit einhergehender Einordnung in die SLC10-Familie durch entsprechend hohe Aminosäuresequenzidentität weisen alle drei Transporter eine unterschiedliche Gewebeexpression mit unterschiedlichen Charakteristika der Substraterkennung auf (s. Einleitung). Deshalb erfolgte ein direkter Substratvergleich durch ein *Screening* mit radioaktiv-markierten Substanzen an stabil transfizierten NTCP-, ASBT-, und SOAT-HEK293-Zellen.

4.3.1 Untersuchung der Expression an stabil transfizierten Zelllinien durch quantitative Real-Time PCR

Zur Kontrolle der vorgesehenen Aufnahmeversuche radioaktiv-markierter Substanzen wurde zunächst die Überexpression von NTCP, ASBT und SOAT in den jeweiligen stabil transfizierten Zelllinien untersucht, wobei zusätzlich die FlpIn-HEK293-Kontrollzellen und die Tetrazyklininduktion in den Test mit einbezogen wurden (Abb. 4.17).

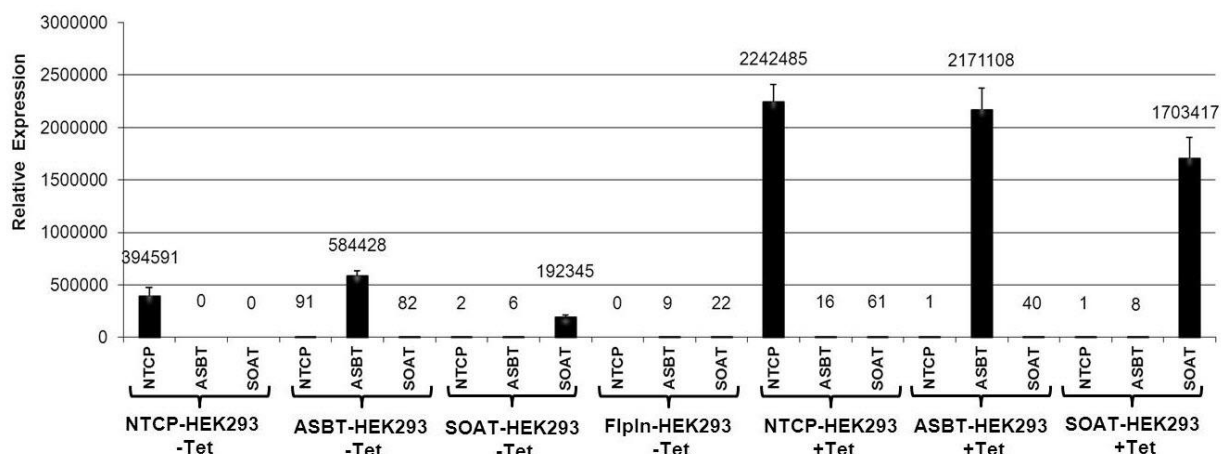


Abb. 4.17: Überprüfung der Expression der stabil transfizierten HEK293-Zelllinien und der FlpIn-HEK293-Kontrollzelllinie mittels quantitativer Real-Time PCR. Alle Zellen wurden für drei Tage mit bzw. ohne Tetrazyklin inkubiert, anschließend RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR eingesetzt. Relative Expression wurde durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode berechnet und zeigt eine x-fach höhere Expression als die Zellen mit der niedrigsten Expression, welche als Kalibrator gesetzt wurden (NTCP-Expression der tetrazyklininduzierten SOAT-HEK293-Zellen). Als endogene Kontrolle diente ACTB. Die Standardabweichungen stellen den entsprechenden Pipettier- und Messfehler dieses Versuchs dar.

Alle mit Tetrazyklin induzierten stabil transfizierten Zelllinien zeigten eine massive Überexpression des stabil integrierten Targets. Jedoch konnte bei denselben Zelllinien auch ohne Tetrazyklininduktion eine Expression nachgewiesen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass bei den generierten stabil transfizierten Zelllinien die Blockade der Promotoraktivität über den Tet-Repressor nicht zu 100 % effizient funktioniert (Döring, Dissertation 2010). Da in den FlpIn-HEK293-Kontrollzellen nur eine extrem geringe ASBT- und SOAT-Expression festgestellt werden konnte, wurden diese als Negativkontrolle für die nachfolgenden Transportversuche herangezogen.

4.3.2 Substratprofil von NTCP, ASBT und SOAT

In stabil transfizierten NTCP- und SOAT-HEK293-Zellen konnte eine statistisch signifikante Aufnahme der sulfatierten Steroidhormone DHEAS, E₁S und PREGS nachgewiesen werden. Beide Transporter weisen für DHEAS, E₁S und PREGS im Vergleich zur FlpIn-Kontrolle ähnliche Transportraten mit einem 11-, 13- und 10-fachen für NTCP, bzw. 15-, 7- und 8-fachen Verhältnis für SOAT auf (Abb. 4.18). Dagegen sind die getesteten sulfatierten Steroidhormone keine Substrate des ASBT.

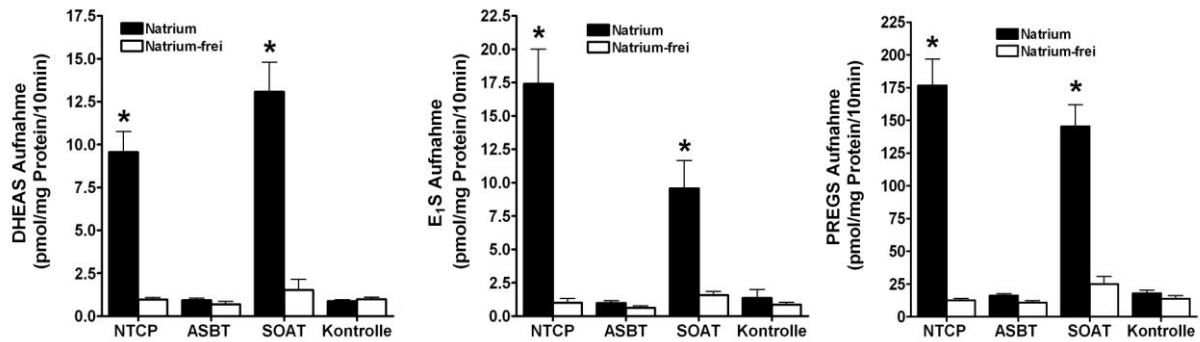


Abb. 4.18: Natrium-abhängige Aufnahme von sulfatierten Steroidhormonen in stabil transfizierten NTCP-, SOAT-, ASBT-HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle). Der Transport in den stabil transfizierten HEK293-Zellen wurde mit jeweils 200 nM DHEAS, E₁S und PREGS mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 10 min gemessen. Alle Werte sind MW ± SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4. * p < 0,001.

Die Glukokortikoide Cortison und Cortisol wurden von keinem der drei Transporter spezifisch in die Zellen transportiert, genauso das glucuronidierte Estrogen Estradiol-17β-D-glucuronid. Für das Estron-3β-D-glucuronid konnte beim NTCP mit Hilfe des *t*-Tests eine statistisch signifikante Aufnahme verglichen mit der Natrium-freien Kontrollaufnahme mit p < 0,001 festgestellt werden (Abb. 4.19).

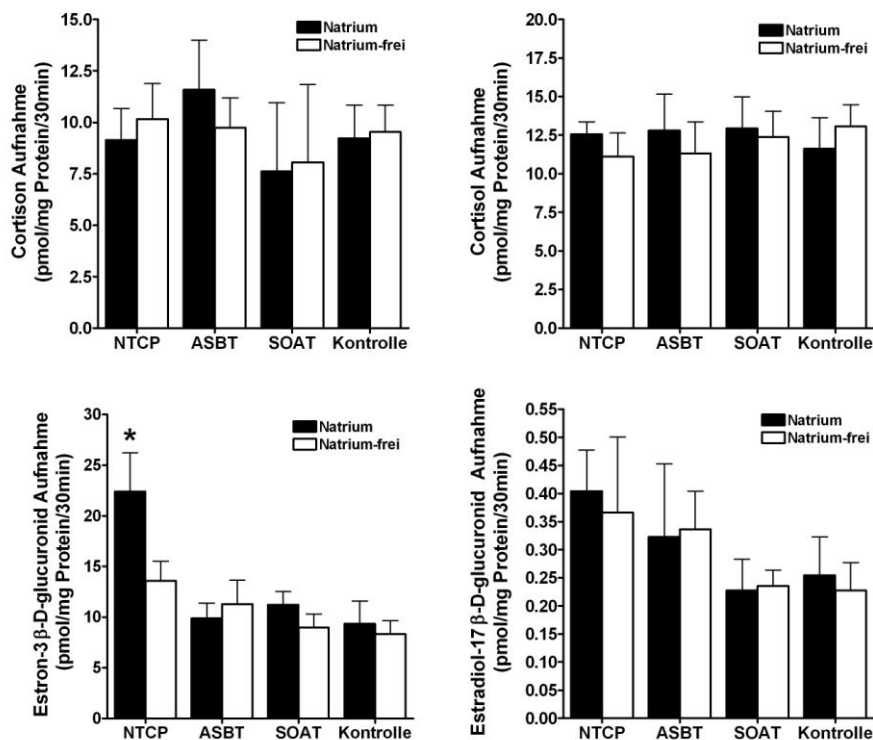


Abb. 4.19: Natrium-abhängige Aufnahme von je 1 μM Cortison, Cortisol, Estron-3β-D-glucuronid und 100 nM Estradiol-17β-D-glucuronid wurde in stabil transfizierten NTCP-, SOAT-, und ASBT- HEK293-Zellen mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 30 min gemessen. FlpIn-HEK293-Zellen dienten als Negativkontrolle. Alle Werte sind MW ± SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4; * p < 0,001.

Für eine Verifizierung des Transports von Estron-3 β -D-glucuronid durch den NTCP wurde eine Zeitreihe mit Bestimmung der Aufnahme zu den Zeitpunkten 1, 5, 10 und 30 min durchgeführt (Abb. 4.20). Während bei der Messung von 1 min die Aufnahme noch nicht signifikant war ($p = 0,075$), konnte mit steigenden Zeiten eine zunehmende Signifikanz festgestellt werden (5 min $p < 0,05$; 10 und 30 min $p < 0,0005$). Zusätzlich wurde eine Inhibition des Transports von Estron-3 β -D-glucuronid mit TC, einem in der Literatur bereits nachgewiesenen Substrat durchgeführt (Abb. 4.20). Bei einer gleichzeitigen Inkubation mit einem 100-fachen Überschuss an TC zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung ($p = 0,01$).

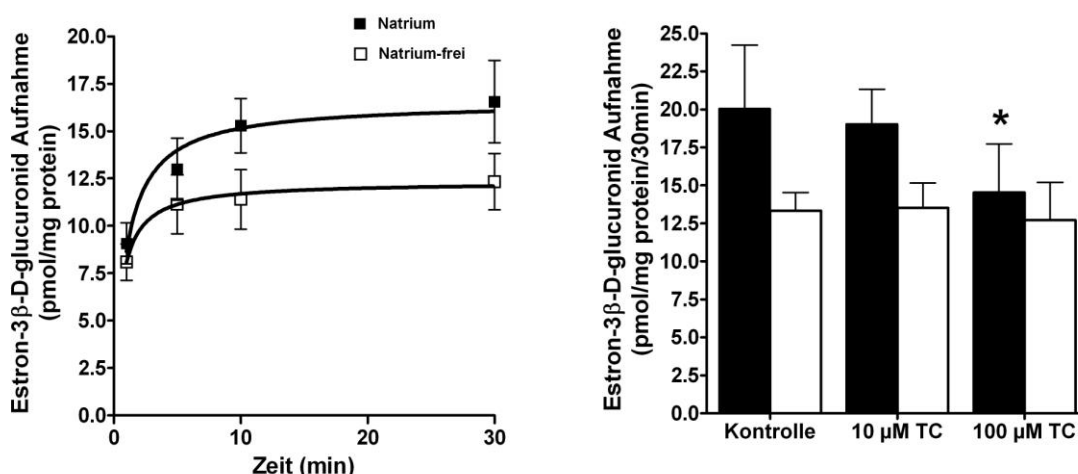


Abb. 4.20: Zeitabhängige Aufnahme (links) von 1 μ M Estron-3 β -D-glucuronid und Inhibition mit 10 μ M und 100 μ M TC (rechts) in stabil transfizierten NTCP- HEK293-Zellen. Schwarze Balken zeigen bei der Inhibition die Aufnahme mit, weiße ohne Natrium in 30 min nach 5 minütiger Präinkubation mit TC an. Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4; * Signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Kontrolle (ohne Inhibitor), $p = 0,01$.

Als Nächstes wurde das Substratspektrum von NTCP, ASBT und SOAT mit nicht konjugierten Gallensäuren und Sarkosincholat überprüft (Abb. 4.21). Cholat, Chenodeoxycholat, Deoxycholat und Sarkosincholat werden sowohl vom NTCP als auch vom ASBT, nicht aber vom SOAT transportiert. Ursodeoxycholat ist ein Substrat des NTCP, aber auch der ASBT scheint diese unkonjugierte Gallensäure statistisch signifikant mit einer sehr niedrigen Kapazität zu transportieren ($p = 0,015$, mit FlpIn-HEK293-Zellen als Kontrolle). Das lipophile Lithocholat wird dagegen von keinem Carrier transportiert.

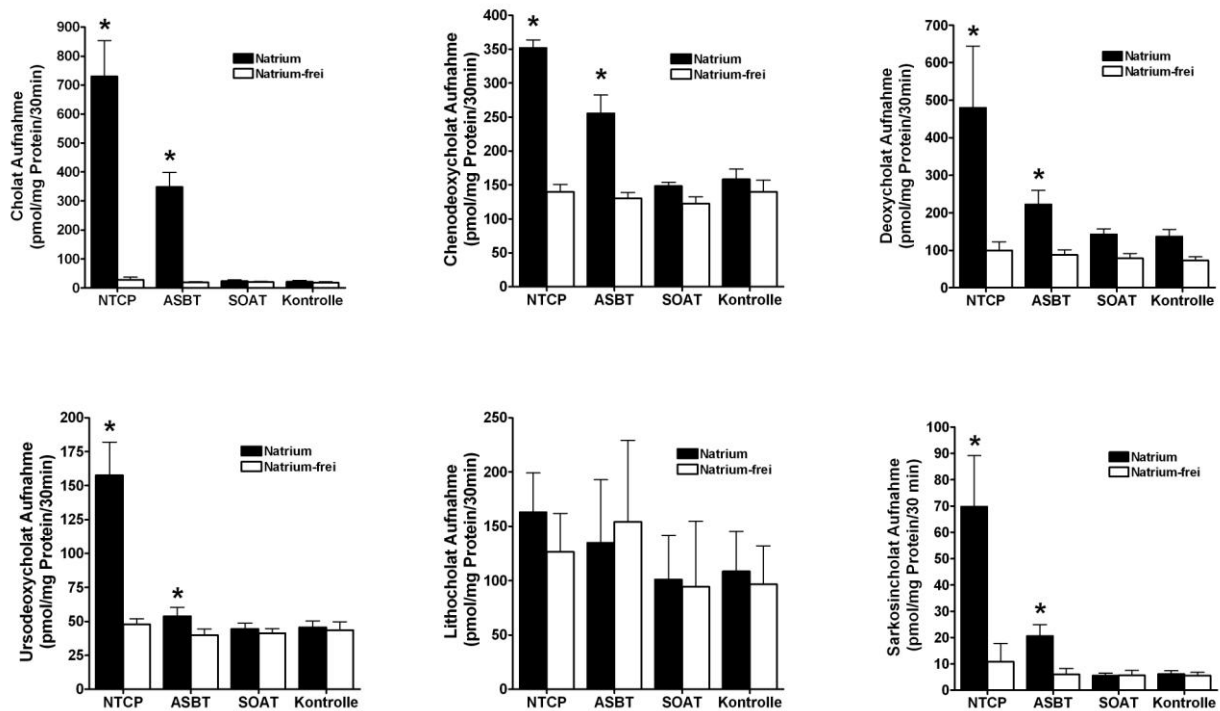


Abb. 4.21: Natrium-abhängige Aufnahme der unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Chenodeoxychol, Deoxychol, Ursodeoxychol, Lithochol und der konjugierten Gallensäure Sarkosinchol in stabil transfizierte NTCP-, SOAT-, ASBT- HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle). Der Transport in den stabil transfizierten HEK293-Zellen wurde mit 1 μ M für die unkonjugierten Gallensäuren und 100 nM für Sarkosinchol mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 30 min gemessen. Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Natrium-freien Kontrolle, $p < 0,02$.

Die mit Glycin konjugierten Gallensäuren Glycochol, Glycodeoxychol, Glychenodeoxychol und Glycoursodeoxychol werden mit einer hohen Transportrate von NTCP und ASBT transportiert, während die Aufnahme durch SOAT mit Werten auf dem Niveau der Negativkontrollen keinen signifikant statistischen Transport zeigte (Abb. 4.22). Obwohl normalerweise alle radioaktiv-markierten Substanzen in minimaler Konzentration auch in den FlpIn-HEK293 Negativkontrollzellen nachgewiesen werden können, war dies für Glycochol nicht der Fall.

TC, Taurodeoxychol, Taurochenodeoxychol und Tauroursodeoxychol wurden mit statistischer Signifikanz in die stabil transfizierten NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen aufgenommen, nicht aber in die SOAT-HEK293-Zellen. Als erste Substanz überhaupt, die durch alle drei Carrier transportiert wird, stellte sich schließlich Taurolithochol (TLC) heraus (Abb. 4.23). Gegenüber den FlpIn-HEK293-Zellen als Negativkontrolle zeigte sich für NTCP, ASBT und SOAT in gleicher Reihenfolge eine 17-, 13- bzw. 6-fache Transportrate; im Vergleich mit den ohne Natrium gemessenen zusätzlichen Kontrollwerten eine 6-, 15, bzw. 3,5-fache Transportrate.

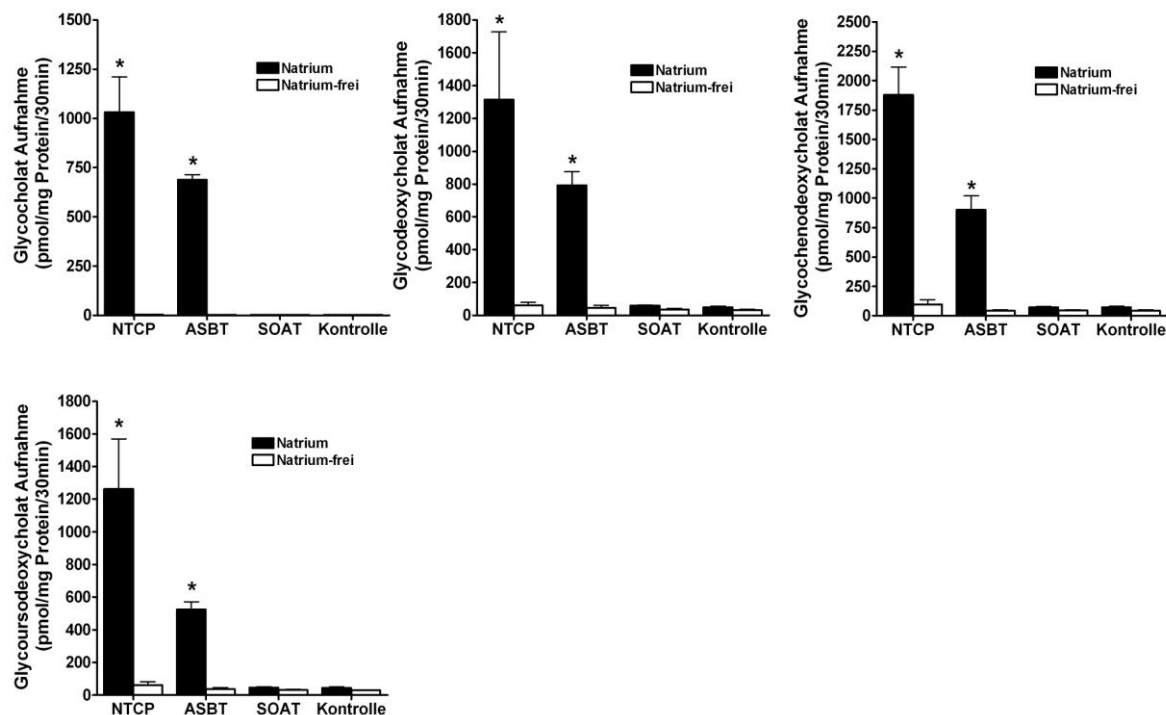


Abb. 4.22: Natrium-abhängige Aufnahme von 1 µM Glycin-konjugierten Gallensäuren Glycocholat, Glycodeoxycholat, Glycochenodeoxycholat und Glycoursodeoxycholat wurde in stabil transfizierte NTCP-, SOAT-, ASBT- HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle) mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 30 min gemessen. Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Natrium-freien Kontrolle, $p < 0,001$.

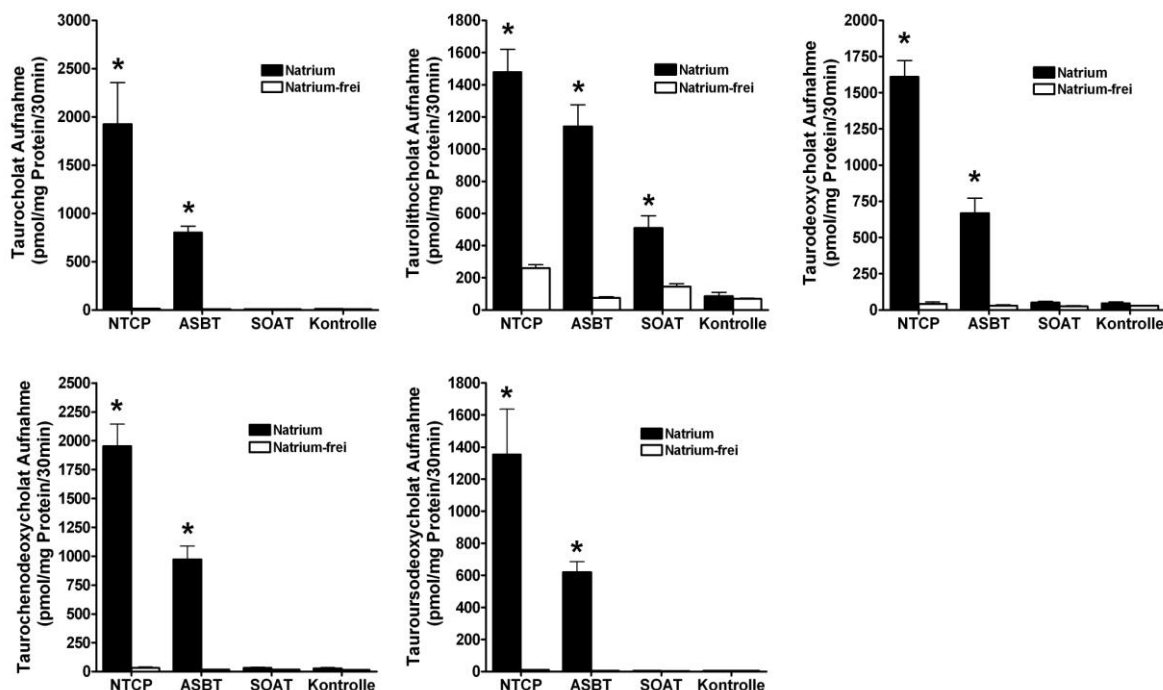


Abb. 4.23: Natrium-abhängige Aufnahme von 1 µM der mit Taurin-konjugierten Gallensäuren Taurocholat, Tauroolithocholat, Taurodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat und Tauroursodeoxycholat wurde in stabil transfizierten NTCP-, SOAT-, ASBT-HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle) mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 30 min gemessen. Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Natrium-freien Kontrolle, $p < 0,001$.

Die Aufnahme des neu identifizierten Substrats TLC wurde in Abhängigkeit der Zeit für alle drei Transporter NTCP, ASBT, SOAT und bei den FlpIn-Kontrollzellen in Anwesenheit von Natrium untersucht (Abb. 4.24). Für die Kontrollzellen konnte wie erwartet über eine Zeit von 30 min kein spezifischer Transport nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine nahezu lineare Aufnahme bis zum Zeitpunkt 10 min; zu diesem Zeitpunkt war die Sättigung bereits fast erreicht, so dass kaum eine weitere Veränderung in den nächsten 20 min bis zum 30 min Zeitpunkt festzustellen war.

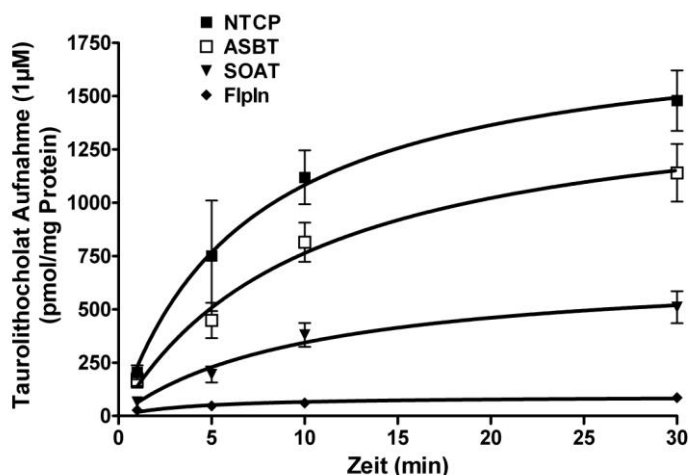


Abb. 4.24: Zeitabhängige Aufnahme von TLC in Anwesenheit von Natrium in stabil transfizierten NTCP-, ASBT-, SOAT-HEK293- und FlpIn-Kontrollzellen. Alle Werte sind MW \pm SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4.

Ein neu erkanntes Substrat muss die Aufnahme eines bereits bekannten kompetitiv hemmen, daher wurde als zusätzliche Kontrolle eine Inhibition der TLC-Aufnahme durch NTCP und ASBT mit einem 10- und 100-fachen Überschuss des bereits bekannten Substrats TC durchgeführt, was zu einer statistisch signifikanten Reduzierung der Aufnahme von TLC führte, während die FlpIn-Kontrollzellen keine statistisch signifikante Hemmung durch TC zeigten. Da DHEAS ein Substrat von NTCP ist, nicht jedoch vom ASBT, wurde für NTCP und SOAT eine Inhibition nach gleichem Prinzip durchgeführt. Zwar konnte die Aufnahme von TLC beim NTCP reduziert werden, jedoch nur minimal im Vergleich zur Inhibition von TC. Der Transport von TLC durch SOAT zeigte dagegen bei einem 10- und 100-fachen Überschuss an DHEAS eine massive Hemmung (Abb. 4.25).

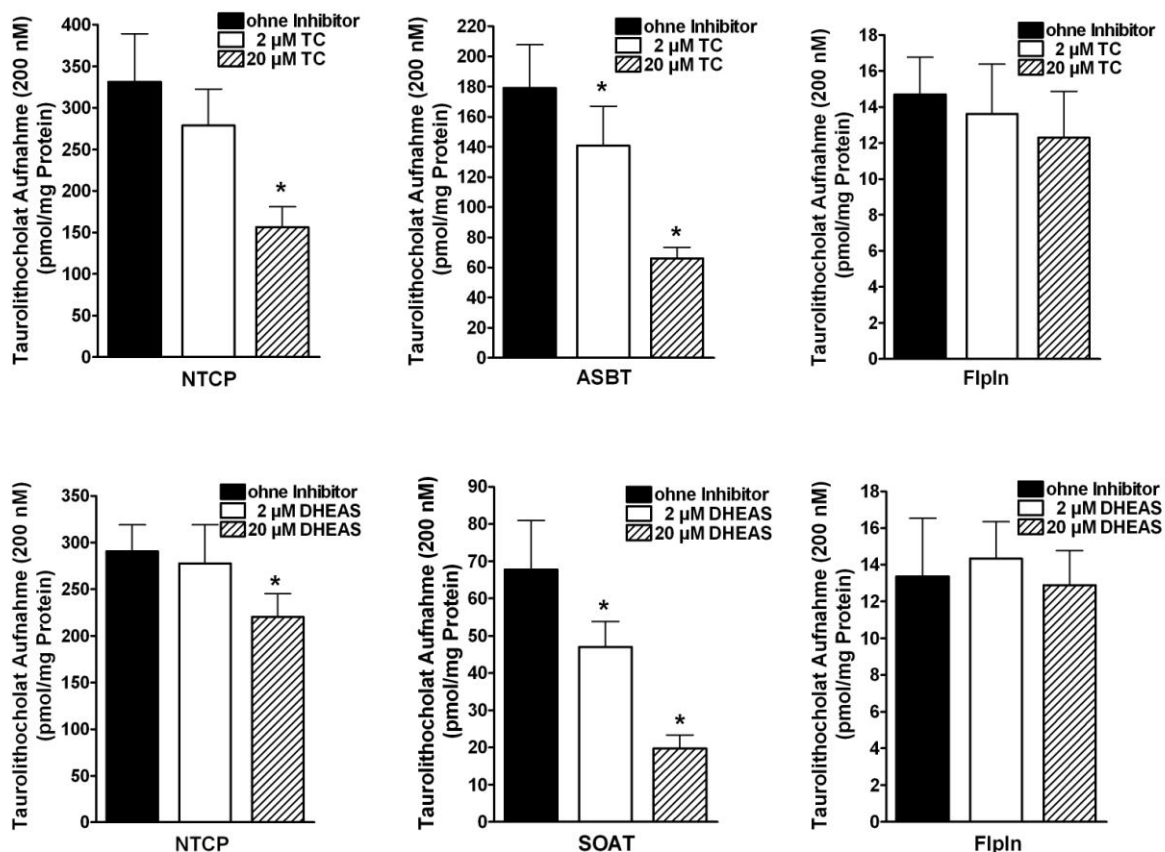


Abb. 4.25: Inhibition von 200 nM TLC mit 2 μM und 20 μM TC oder DHEAS in stabil transfizierten NTCP-, ASBT- und SOAT-HEK293-Zellen und zur Kontrolle FlpIn-HEK293-Zellen. Der Versuch wurde mit Natrium-haltigem Transportpuffer durchgeführt; nach 5 minütiger Präinkubation mit dem Inhibitor wurde [³H]TLC zugegeben, um eine Endkonzentration von 200 nM zu erhalten, und die Messung nach weiteren 5 min beendet. Alle Werte sind MW ± SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4; *Signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Kontrolle (ohne Inhibitor), p < 0,02.

4.3.3 Kinetische Transportbestimmungen für NTCP, ASBT und SOAT

Für einen direkten Vergleich der Affinitäten und Kapazitäten von NTCP, ASBT und SOAT mit DHEAS, E₁S, PREGS, TC und TLC wurden erstmals alle Messungen in stabil transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Die kinetische Bestimmung des Transports von DHEAS, E₁S und PREGS für SOAT wurde bereits veröffentlicht (Geyer et al. 2007), wird in der Diskussion behandelt und in Tab. 5.1. gezeigt. Tab. 4.6 zeigt einen Vergleich der kinetischen Parameter für den Transport von DHEAS, E₁S und PREGS in NTCP-HEK293-Zellen, die nach nicht-linearer Regressionsanalyse (Michaelis-Menten-Kinetik) berechnet und durch Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Transformation linearisiert dargestellt sind (Abb. 4.26). Für DHEAS und E₁S wurden sehr ähnliche niedrige Affinitäten und hohe Kapazitäten berechnet. PREGS wird dagegen mit einer hohen Affinität und niedrigen Kapazität transportiert.

Die Transformation nach Hill ergibt einen Hill-Koeffizienten für DHEAS von 1,06, für E₁S von 0,94 und für PREGS von 0,95; Werte, die für eine einzelne Bindungsstelle sprechen.

Zudem wurde das neu identifizierte Substrat TLC in Bezug auf seine kinetischen Parameter untersucht (Tab. 4.7, Abb. 4.27). TLC zeigt zum NTCP und SOAT ähnlich hohe Affinitäten, NTCP jedoch eine 10-fach höhere Kapazität als SOAT. Die Transformation nach Lineweaver-Burk mit Berechnung der K_m - und V_{max} -Werte zeigt abweichend einen extrem hohen V_{max} -Wert von 20640 pmol/mg Protein/min an. ASBT kann mit der höchsten Affinität als *high affinity Transporter* für TLC angesehen werden, während die Kapazität zwischen den für SOAT und NTCP ermittelten Werten liegt. Für eine einzelne Bindungsstelle sprechend, ergab die Transformation nach Hill für TLC einen Hill-Koeffizienten für NTCP von 1,07, für ASBT von 1,29 und für SOAT von 0,94.

Die Bestimmung der V_{max} - und K_m -Werte von TC offenbarte eine fast identische Affinität zum NTCP und ASBT (Tab. 4.8, Abb. 4.28). Auch die Kapazitäten beider Transporter sind ähnlich mit leicht erhöhten V_{max} -Werten für NTCP. Die Transformation nach Hill ergab für TC einen Hill-Koeffizienten für NTCP von 0,89 und für ASBT von 1,08, so dass auch hier von einer einzelnen Bindungsstelle ausgegangen werden kann.

Tab. 4.6: Transportkinetische Parameter von DHEAS, E₁S und PREGS wurden in stabil transfizierten NTCP-HEK293-Zellen bestimmt. Die Tabelle zeigt eine Auflistung der kinetischen Parameter von K_m (in μ M) und V_{max} (in pmol/mg Protein/min) nach Michaelis-Menten mittels nicht-linearer Regression, Eadie Hofstee, Hanes Woolf und Lineweaver-Burk Transformation. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 4*.

		DHEAS	E ₁ S	PREGS
Michaelis-Menten Kinetik	K_m	56,1 ± 8,0	57,6 ± 11,3	8,8 ± 2,1
	V_{max}	2198 ± 101,7	2367 ± 170,8	1036 ± 69,1
Eadie Hofstee Transformation	K_m	67,8 ± 10,4	37,4 ± 5,2	10,3 ± 1,4
	V_{max}	2262 ± 227,0	2013 ± 171,2	1072 ± 86,5
Hanes-Woolf Transformation	K_m	62,8	49,2	8,0
	V_{max}	2183	2279	978
Lineweaver-Burk Transformation	K_m	100,7	36,8	17,1
	V_{max}	2376	1982	1519

Tab. 4.7: Transportkinetische Parameter von TLC wurden in stabil transfizierten NTCP-, ASBT- und SOAT-HEK293-Zellen bestimmt. Die Tabelle zeigt eine Auflistung der kinetischen Parameter von K_m (in μM) und V_{max} (in pmol/mg Protein/min) nach Michaelis-Menten mittels nicht-linearer Regression, Eadie Hofstee, Hanes Woolf und Lineweaver-Burk Transformation. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 4*.

		NTCP	ASBT	SOAT
Michaelis-Menten Kinetik	K_m	18,4 \pm 2,3	5,9 \pm 1,8	19,3 \pm 6,8
	V_{max}	5915 \pm 189,5	1585 \pm 99,7	617 \pm 57,0
Eadie Hofstee Transformation	K_m	23,5 \pm 5,1	7,3 \pm 1,2	10,5 \pm 2,2
	V_{max}	6118 \pm 783,1	1635 \pm 121,5	531 \pm 57,9
Hanes-Woolf Transformation	K_m	22,6	3,6	16,0
	V_{max}	6026,0	1473	602
Lineweaver-Burk Transformation	K_m	109,7	9,2	7,8
	V_{max}	20640	1808	447

Tab. 4.8: Transportkinetische Parameter von TC wurden in stabil transfizierten NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen bestimmt. Die Tabelle zeigt eine Auflistung der kinetischen Parameter von K_m (in μM) und V_{max} (in pmol/mg Protein/min) nach Michaelis-Menten mittels nicht-linearer Regression, Eadie Hofstee, Hanes Woolf und Lineweaver-Burk Transformation. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 4*.

		NTCP	ASBT
Michaelis-Menten Kinetik	K_m	13,1 \pm 0,8	14,7 \pm 1,5
	V_{max}	2395 \pm 59,0	1821 \pm 75,1
Eadie Hofstee transformation	K_m	17,0 \pm 2,3	19,9 \pm 2,3
	V_{max}	2633 \pm 273,9	2055 \pm 191,6
Hanes-Woolf Transformation	K_m	16,2	18,2
	V_{max}	2544	1930
Lineweaver-Burk Transformation	K_m	28,2	34,4
	V_{max}	3647	3365

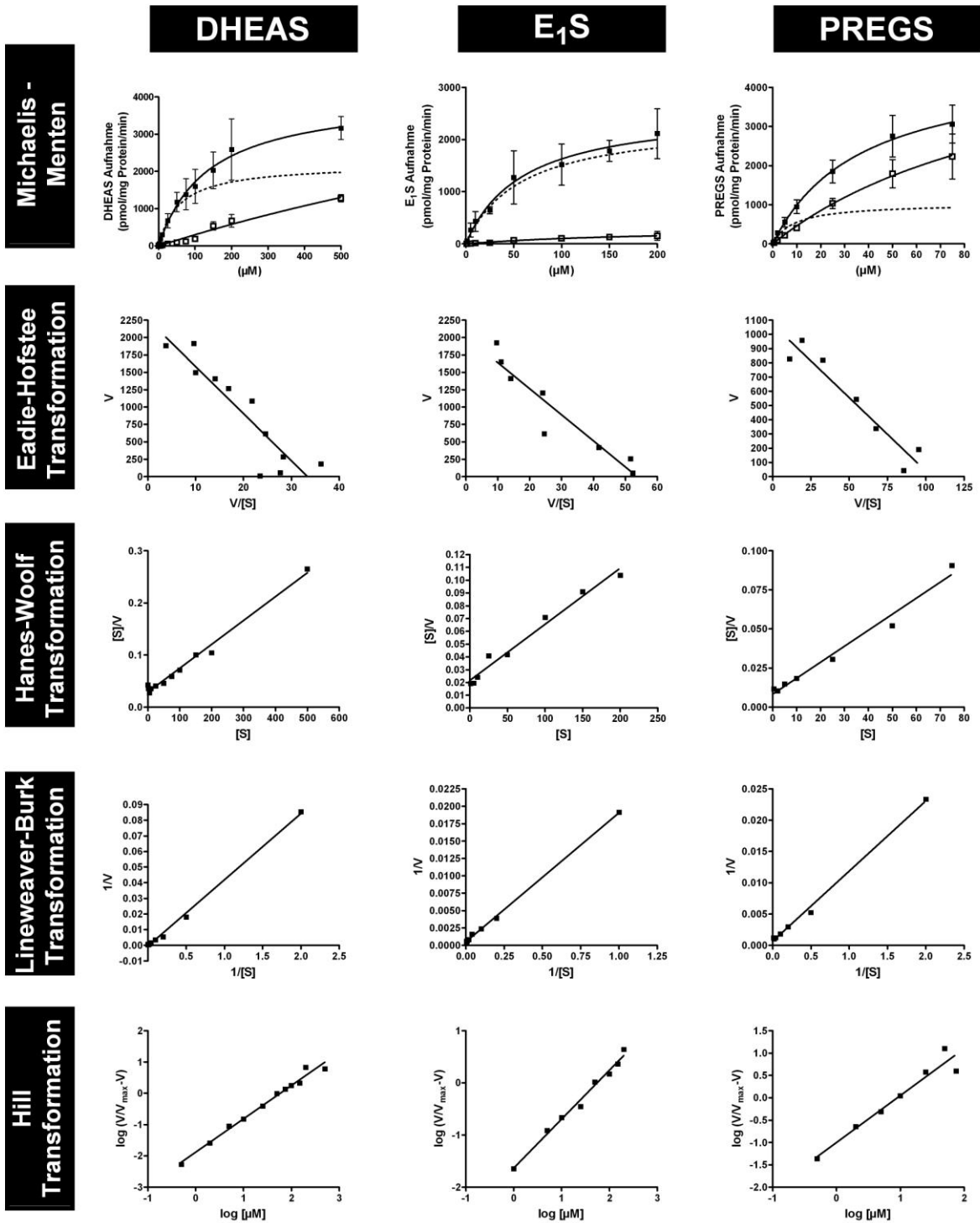


Abb. 4.26: Konzentrationsabhängiger Transport von DHEAS, E₁S und PREGS in NTCP-HEK293-Zellen. Tetrazyklin-induzierte NTCP-HEK293 (■) und FlpIn-Kontrollzellen (□) wurden für 1 min mit den angegebenen Konzentrationen [³H]DHEAS, [³H]E₁S und [³H]PREGS bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Bei der nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dargestellt. Die NTCP-spezifische Aufnahme (----) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Aufnahme von der Aufnahme in die NTCP-HEK293-Zellen ermittelt. Die Visualisierung der Linearisierungsverfahren der berechneten Kinetiken nach Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Transformationen erfolgte durch *GraphPad Prism* 4, die berechneten Werte finden sich in Tab. 4.6. Die Transformation nach Hill ergibt einen Hill-Koeffizienten für DHEAS von 1,06, für E₁S von 0,94 und für PREGS von 0,95. Diese Werte sprechen für eine einzelne Bindungsstelle.

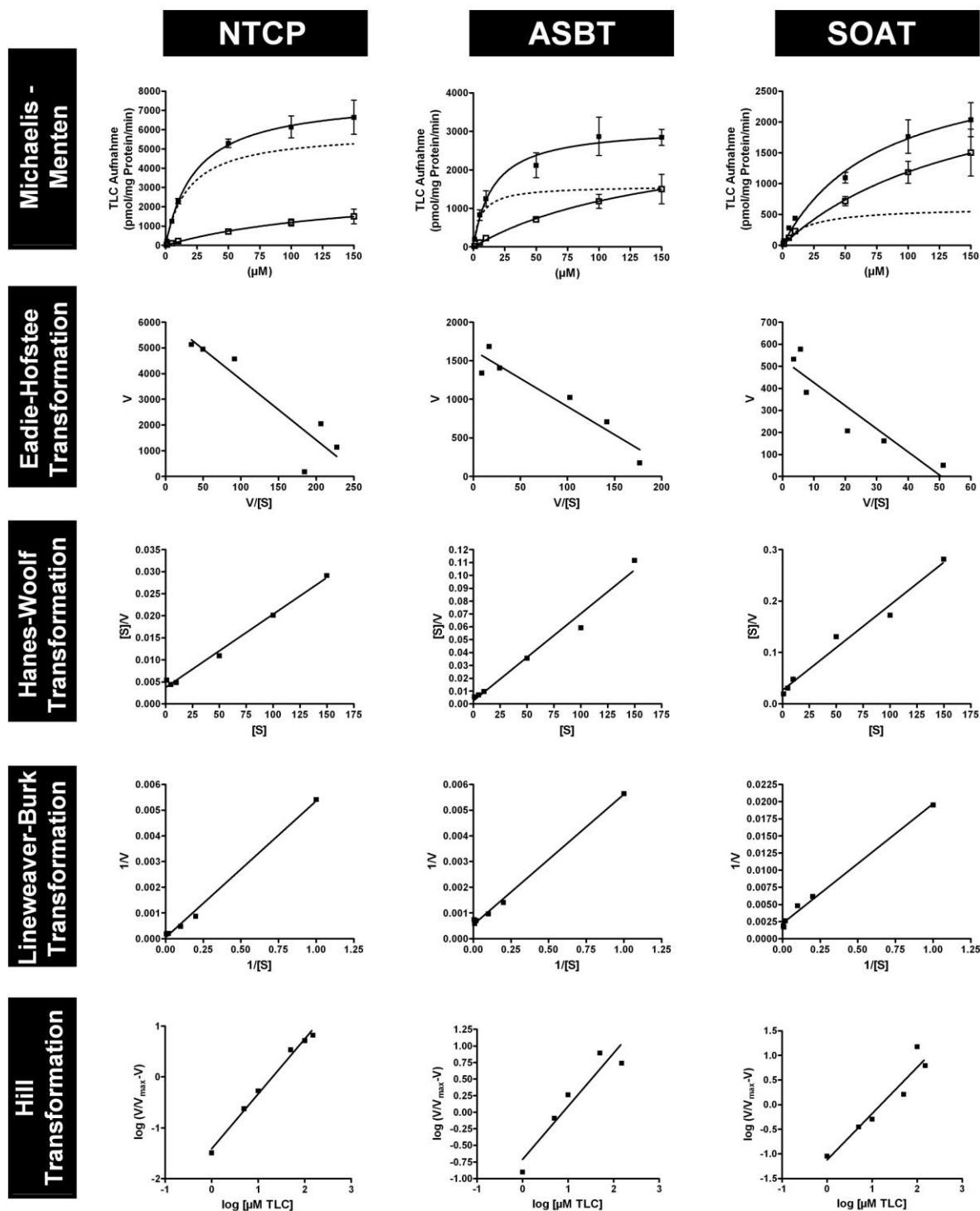


Abb. 4.27: Konzentrationsabhängiger Transport von TLC in NTCP-, ASBT-, und SOAT-HEK293-Zellen. Tetrazyklin-induzierte stabil transfizierte HEK293 (■) und FlpIn-HEK293-Kontrollzellen (□) wurden für 1 min mit den angegebenen Konzentrationen [³H]TLC bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zellyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Bei der nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dargestellt. Die NTCP-, ASBT-, und SOAT- spezifische Aufnahme (----) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Aufnahme von der Aufnahme in die HEK293-Zellen mit stabil transfizierten Transportern ermittelt. Die Visualisierung der Linearisierungsverfahren der berechneten Kinetiken nach Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Transformationen erfolgte durch *GraphPad Prism 4*, die berechneten Werte finden sich in Tab. 4.7. Die Transformation nach Hill ergibt einen Hill-Koeffizienten für NTCP von 1,07, für ASBT von 1,29 und für SOAT von 0,94.

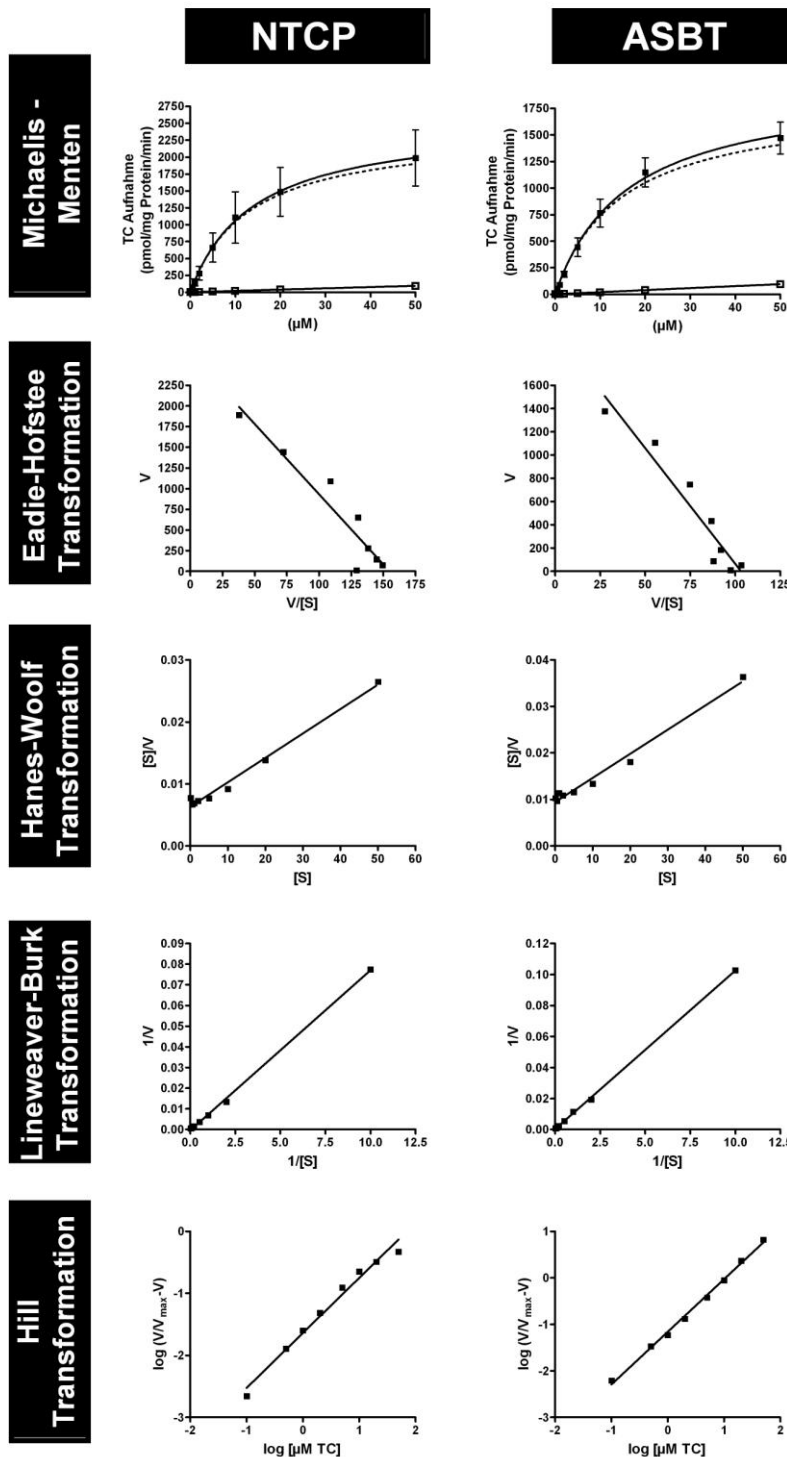


Abb. 4.28: Konzentrationsabhängiger Transport von TC in NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen. Tetrazyklin-induzierte stabil transfigierte HEK293- (■) und FlpIn-Kontrollzellen (□) wurden für 1 min mit den angegebenen Konzentrationen [³H]TC bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Zelllyse wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Bei der nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung dargestellt. Die NTCP- und ASBT spezifische Aufnahme (----) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Aufnahme von der Aufnahme in die HEK293-Zellen mit stabil transfigierten Transportern ermittelt. Die Visualisierung der Linearisierungsverfahren der berechneten Kinetiken nach Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk Transformationen erfolgte durch *GraphPad Prism 4*, die berechneten Werte finden sich in Tab. 4.8. Die Transformation nach Hill ergibt einen Hill-Koeffizienten für NTCP von 0,89 und für ASBT von 1,08. Diese Werte sprechen für eine einzelne Bindungsstelle.

4.3.4 Kontrolle der Gallensäuren durch Dünnschichtchromatographie

Mittels Dünnschichtchromatographie lassen sich kleinste Mengen von Stoffgemischen in ihre Reinstoffe auftrennen, die dann meistens eine unterschiedliche Laufstrecke in der mobilen Phase zurücklegen und so mehrere Peaks anzeigen. Deshalb wurde diese Methode angewandt, um die Reinheit der zur Transportmessung benutzten radioaktiv-markierten Gallensäuren zu überprüfen. Zwar können für jede Substanz zur Überprüfung sogenannte R_f -Wer-

te angegeben werden, die ein Verhältnis der zurückgelegten Wegstrecke zur Laufmittelfront darstellen; jedoch sind diese R_f -Werte von sehr vielen Parametern wie Dünnschicht-Platte, Luftfeuchtigkeit und vor allem dem Laufmittel abhängig und sind daher generell schlecht reproduzierbar. Zur Überprüfung der verschiedenen Gallensäuren stellte sich das Laufmittel mit Butanol, Eisessig und Aqua bidest. im Verhältnis 5 / 2 / 3 als geeignet heraus. Auf diese Weise konnte für einen überwiegenden Teil der verwendeten Gallensäuren eine hohe Reinheit bestätigt werden (Abb. 4.29). An Position 145 mm konnte ein kleiner Peak bei Sarkosincholat, den Glycin-konjugierten Gallensäuren und Taurodeoxycholat festgestellt werden, was auf eine leichte Verunreinigung mit einer nicht näher definierten Substanz hindeutet. Durch Flächenauswertung mit dem Dünnschichtprogramm GINA Star TLC™ Version 2.18 konnte für Sarkosincholat eine ca. 78 %ige Reinheit, für die Glycin-konjugierten Gallensäuren und Taurodeoxycholat eine ca. 91 %ige Reinheit berechnet werden.

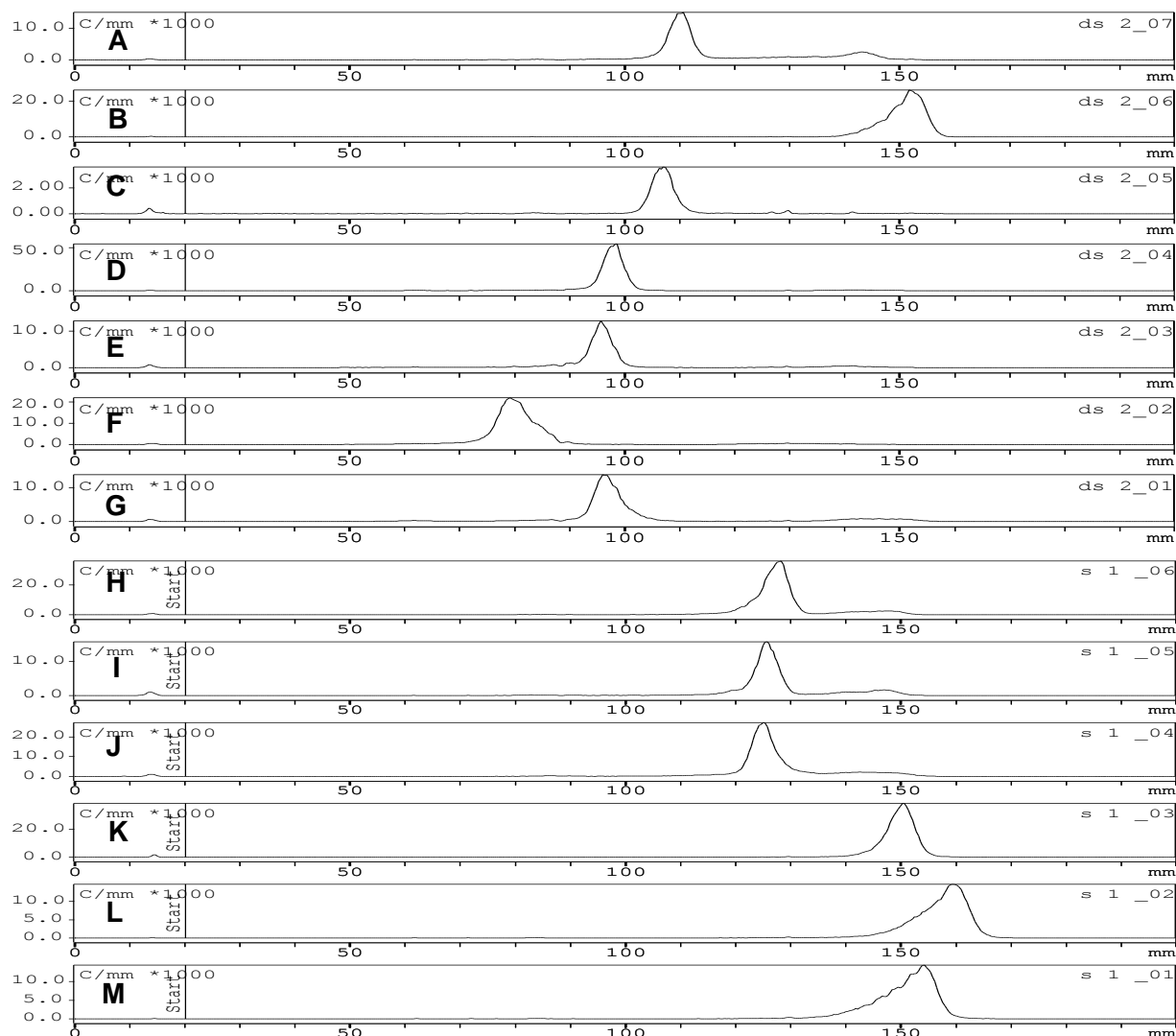


Abb. 4.29: Dünnschichtchromatographie zur Überprüfung der Reinheit der von der University of California, USA, und Sanofi-Aventis zur Verfügung gestellten Gallensäuren. A: Sarkosincholat, B: Lithocholat, C: TLC, D: Tauroursodeoxycholat, E: Taurochenodeoxycholat, F: TC, G: Taurodeoxycholat, H: Glycoursodeoxycholat, I: Glycochenodeoxycholat, J: Glycodeoxycholat, K: Ursodeoxycholat, L: Deoxycholat, M: Cholat, Laufmittelfront bei 20 cm.

4.3.5 Aufnahmeversuche mit Tauroolithocholat-3-sulfat

4.3.5.1 Transportmessung mit Tauroolithocholat-3-sulfat

Infolge der Bestätigung des Transports von TLC als neues Substrat aller drei Carrier wurde die sulfatierte Form, das Tauroolithocholat-3-sulfat (TLCS), näher untersucht, nachdem bereits erste Aufnahmeversuche mit dieser Substanz durchgeführt worden waren (Döring, Dissertation 2010). Für TLCS konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Aufnahme in NTCP-, ASBT-, und SOAT-HEK293-Zellen festgestellt werden (Abb. 4.30, $p < 0,005$).

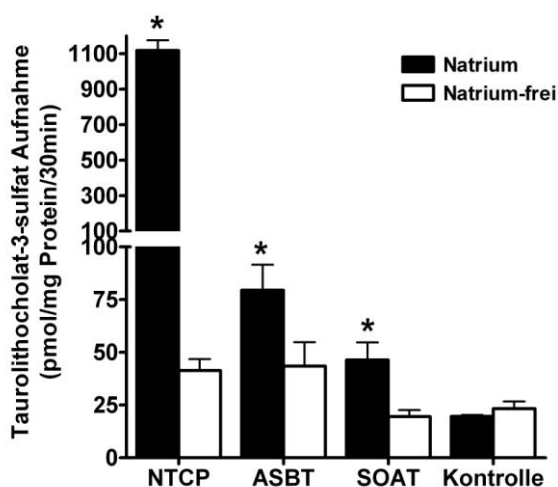


Abb. 4.30: Aufnahme von 1 µM TLCS wurde in stabil transfizierten NTCP-, SOAT-, ASBT-HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle) mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 30 min gemessen. Alle Werte sind MW ± SD zweier unabhängiger Versuche mit je n=4. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Natrium-freien Kontrolle, $p < 0,005$.

Zur Kontrolle der Reinheit wurde die radioaktiv-markierte Substanz auf einer Kieselgelplatte aufgetragen und nach Erreichen der Laufmittelfront im Radio-Dünnschicht-Analysator untersucht. Der Substanz wurde von der Firma Tritec eine 98 %ige Reinheit bescheinigt. Die dünnschichtchromatographische Analyse ergab einen Hauptpeak bei ca. 75 mm und 2 weitere kleine Peaks bei ca. 130 und 155 mm (Abb. 4.31). Durch Flächenberechnung mit dem Dünnschicht-Auswertungsprogramm Gina Star TLC™ konnte für den Hauptpeak ein prozentualer Anteil von 93,5 %, für die nachfolgenden Peaks von 3,5 bzw. 1,5 % errechnet werden.

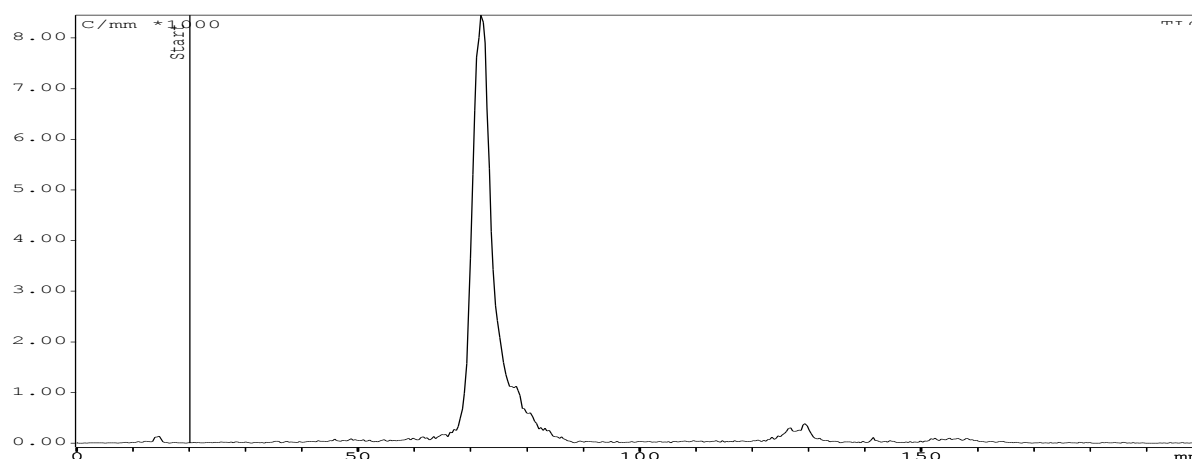


Abb. 4.31: Dünnschichtchromatographische Analyse der in Alkohol gelösten unaufgereinigten Stammlösung von [^3H]TLCS.

Deshalb wurde zur Aufreinigung der Substanz eine große Menge von TLCS auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und nach dem Lauf die vorhandene Substanz im Hauptpeak aus der Folie gekratzt, mehrmals in Ethanol und Methanol gelöst und durch Abdampfen konzentriert. Bei Überprüfung der aufgereinigten Substanz konnte nur noch ein Peak gefunden werden (Abb. 4.32, I). Zusätzlich wurde die in Transportversuchen benutzte wässrige Messlösung und die lysierten Zellen nach dem Transportversuch dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei wurde die Messlösung, die sowohl [^3H]TLCS als auch einen hohen Anteil nicht-radioaktiver Substanz enthält, zur Verbesserung der Löslichkeit für zwei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde noch aufgereinigte TLCS-Stammlösung, Taurin und Lithocholat auf die Dünnschichtfolie aufgetragen. Dabei zeigten sich sowohl bei aufgereinigten und nicht aufgereinigten TLCS-Messlösungen sowie bei den durch die SOAT-HEK293- und FlpIn-HEK293-Zellen aufgenommenen Messlösungen keine Unterschiede; ein wiederkehrendes Muster aus mindestens 6 Peaks konnte bei allen mit Wasser in Berührung gekommenen Proben festgestellt werden. Dagegen zeigten die in Ethanol gelösten Stammlösungen von Taurin, Lithocholat und dem aufgereinigten TLCS wie erwartet nur einen Peak. Das TLCS scheint in hydrophiler Lösung in verschiedene Bestandteile zu zerfallen, eine metabolische Umsetzung durch Enzyme ist auszuschließen, da nicht nur die Zellen, sondern auch die angesetzte Messlösung keinerlei Differenzen aufweisen.

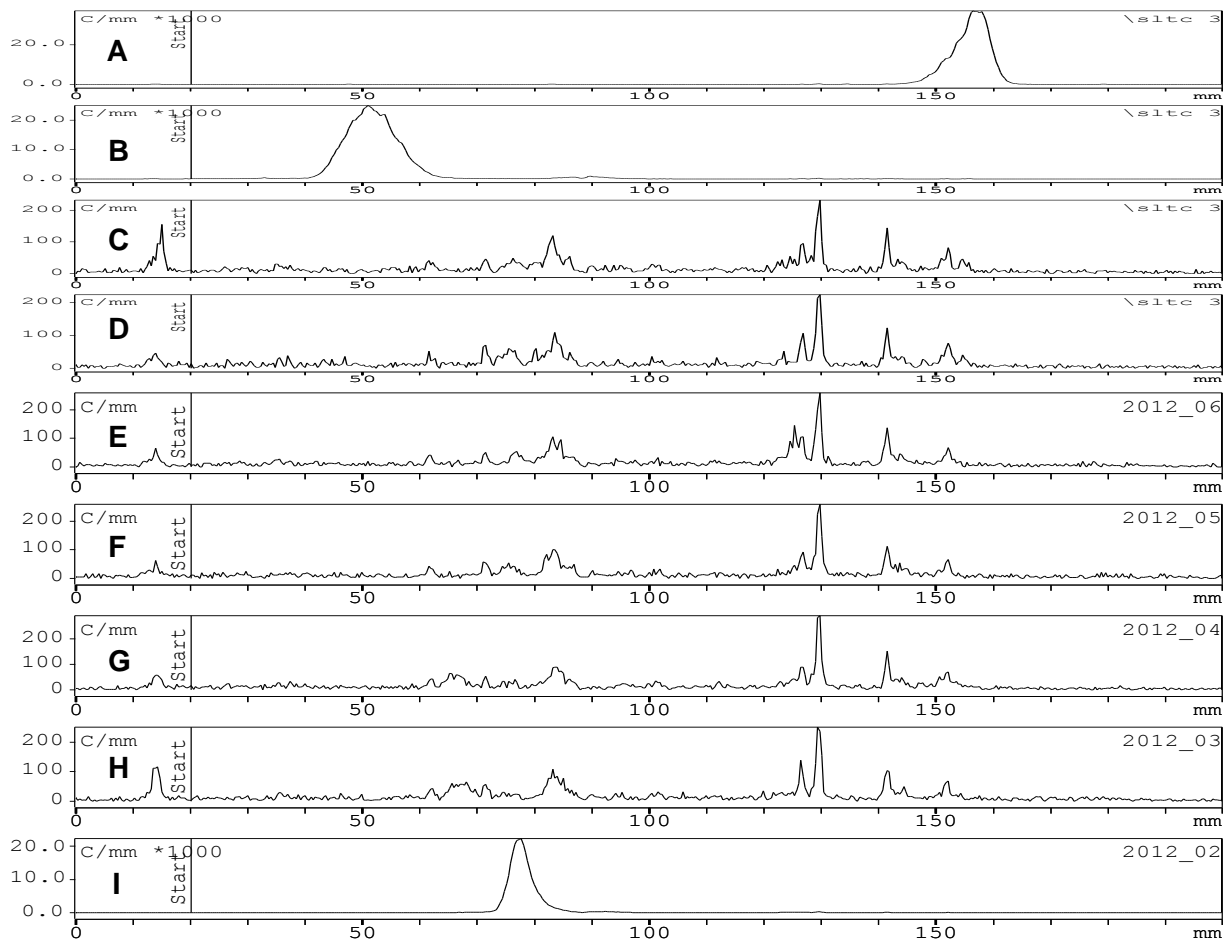


Abb. 4.32: Dünnschichtchromatographische Analyse, A: Lithocholat, **B:** Taurin, **C:** Zelllysate nach Aufnahme der Messlösung (ML) mit aufgereinigtem TLCS durch FlpIn-HEK293-Zellen, **D:** wie C mit nicht aufgereinigtem TLCS, **E:** Zelllysate nach Aufnahme der Messlösung (ML) mit aufgereinigtem TLCS durch SOAT-HEK293-Zellen, **F:** wie E mit nicht aufgereinigtem TLCS, **G:** aufgereinigte Messlösung mit TLCS, **H:** nicht aufgereinigte Messlösung mit TLCS, **I:** aufgereinigte TLCS Stammlösung in Ethanol.

Bei einer nur 15-minütigen Inkubation der Messlösung bei 37°C blieb das TLCS zum großen Teil erhalten, was auf einen zeitabhängigen Prozess schließen lässt (Abb. 4.33). Nach Aufnahme derselben Messlösung in SOAT-HEK293-Zellen war jedoch das zuvor schon erwähnte Muster verschiedener Peaks zu erkennen, wobei aber ein deutlicherer Anteil des TLCS-Peaks zu erkennen ist.

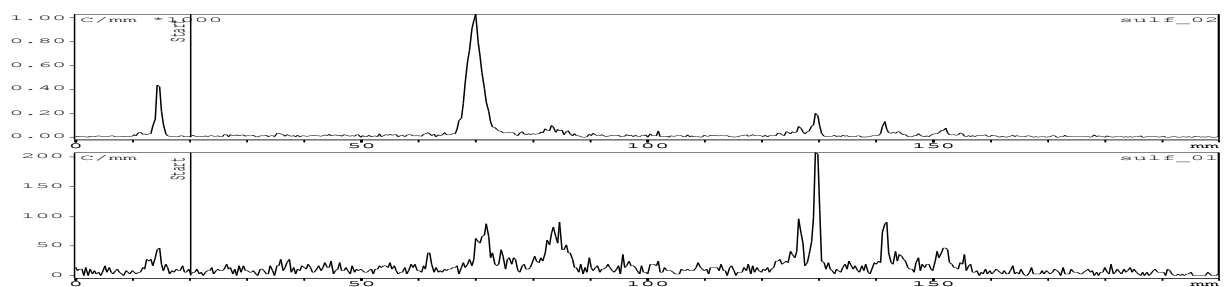


Abb. 4.33: Dünnschichtchromatographische Analyse der für Transportversuche angesetzten natriumhaltigen, wässrigen Messlösung von TLCS (**oben**). Die Lösung wurde nur 15 min vor dem Versuch angesetzt. Zusätzlich wurde die gleiche Messlösung für einen Transportversuch an SOAT-HEK293-Zellen verwendet und die aufgenommene Radioaktivität der lysierten Zellen auf die Kieselgelplatte aufgetragen (**unten**).

4.3.5.2 Transportmessung mit aufgereinigtem Tauroolithocholat-3-sulfat

Mit dem aufgereinigten TLCS wurden die Aufnahmemessungen drei Mal mit je $n = 4$ wiederholt, wobei darauf geachtet wurde, die Messlösungen kurzfristig vor dem Versuch anzusetzen. Für den NTCP und ASBT zeigte sich weiterhin eine statistisch signifikante Aufnahme sowohl gegenüber den FlpIn-HEK293-Zellen als auch gegenüber der Natrium-freien Kontrolle (Abb. 4.34); die statistische Signifikanz der TLCS Aufnahme blieb für SOAT gegenüber der FlpIn-Kontrolle bestehen, jedoch nicht hinsichtlich der Natrium-freien Kontrolle.

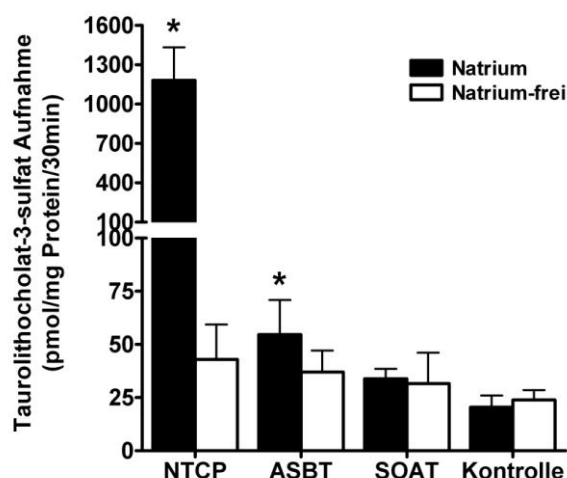


Abb. 4.34: Aufnahme von 1 µM Tauroolithocholat-3-sulfat nach dünn-schichtchromatographischer Aufreinigung wurde in stabil transfizierte NTCP-, SOAT-, ASBT- HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle) mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 30 min gemessen. Alle Werte sind MW \pm SD von drei unabhängigen Versuchen mit je $n=4$. *Signifikant höhere Aufnahme im Vergleich zur Natrium-freien Kontrolle, $p < 0,005$.

4.3.5.3 Aufnahme und Inhibition durch Taurin

Um eine mögliche Verunreinigung mit Taurin auszuschließen, wurde ein Aufnahmeversuch an SOAT-HEK293-Zellen durchgeführt, sowie eine mögliche Inhibition des Transports von DHEAS durch SOAT getestet (Abb. 4.35). Zwar scheint ein Natrium-abhängiger Transporter in der HEK293-Zelllinie zu existieren, dieser ist jedoch nicht abhängig vom SOAT; auch der DHEAS-Transport von SOAT konnte nicht durch einen hohen Überschuss an Taurin gehemmt werden, Taurin ist also kein Substrat.

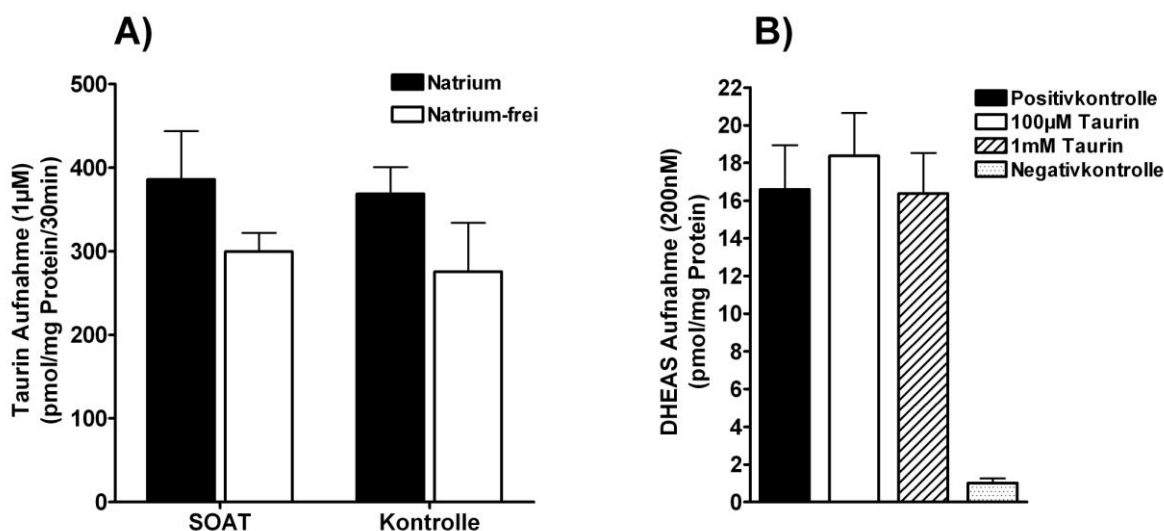


Abb. 4.35: Aufnahme von 1 μM Taurin (A) wurde in stabil transfizierten SOAT-HEK293-Zellen und FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle) mit (schwarze Balken) und ohne Natrium (weiße Balken) in einer Zeit von 30 min gemessen. **Inhibition von 200 nM DHEAS durch 100 μM und 1 mM Taurin (B).** Positivkontrolle zeigt die Aufnahme von DHEAS über einen Zeitraum von 30 min in SOAT-HEK293-Zellen ohne Inhibitor; Negativkontrolle die Aufnahme von DHEAS in FlpIn-HEK293-Zellen. Alle Werte sind MW ± SD von zwei unabhängigen Versuchen mit je n=4.

4.4 Generierung eines 3D-QSAR Pharmakophormodells für SOAT

4.4.1 Bestimmung von IC₅₀- Werten

Zur Generierung eines Pharmakophormodells können entweder IC₅₀- oder K_i-Werte bestimmt werden. Zur Entwicklung der SOAT-Pharmakophore wurden von mehr als 100 Substanzen IC₅₀-Werte bestimmt, wobei darauf geachtet wurde, zum einen sehr verschiedene chemische Substanzklassen wie z.B. Gallensäuren, Benzothiazepine, Barbiturate, Propanolamine etc. einzusetzen, zum anderen innerhalb einer Klasse auf minimale Variationen zu achten. Abb. 4.36 zeigt exemplarisch anhand von TLC die Bestimmung eines IC₅₀-Werts (s. Kap. 3.7.3), der die Konzentration des Inhibitors angibt, in diesem Fall 3 μM, bei der die Aufnahme des Substrats um 50 % inhibiert wird.

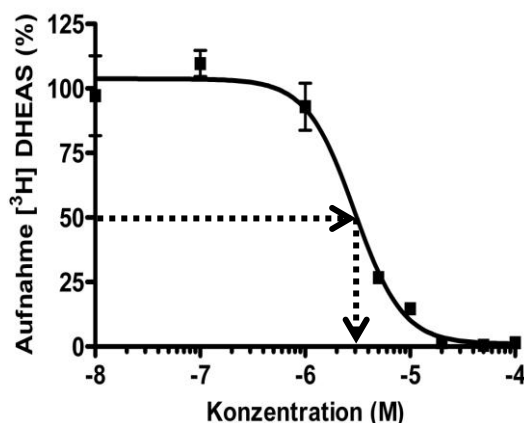


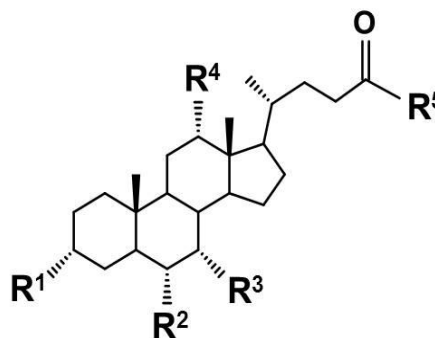
Abb. 4.36: Bestimmung von IC_{50} -Werten (Beispiel Tauroolithocholat): 100 % Aufnahme von $[^3H]$ DHEAS (Y- Achse) wurde durch Zugabe von ansteigenden Konzentrationen von Tauroolithocholat inhibiert (logarithmisch auf der X-Achse dargestellt). Der IC_{50} -Wert von 3 μM wurde mit GraphPad Prism 4 (sigmoidale Dosiswirkung, variable Neigung) berechnet und gibt die Konzentration des Inhibitors an, bei der die Aufnahme des Substrats um 50 % inhibiert wird. Angegeben sind $MW \pm SD$ eines repräsentativen Experiments mit $n=4$.

4.4.2 Initiales Screening

Zu Beginn der Inhibitionsmessungen wurden eine Reihe von physiologisch vorkommenden Gallensäuren auf ihre Fähigkeit überprüft, den Na^+ -abhängigen Transport von $[^3H]$ DHEAS zu hemmen. Tab. 4.9 demonstriert die Struktur der dargestellten Gallensäuren mit den entsprechenden chemischen Seitenketten oder Gruppen an den angezeigten Positionen der Steroidstruktur (R^1 bis R^5) zusammen mit den zugehörigen IC_{50} -Werten. Insgesamt konnte allein bei den Gallensäuren ein inhibitorischer Bereich von mehr als vier Zehnerpotenzen abgedeckt werden. Ein direkter Vergleich von Lithocholat und TLC mit ihren korrespondierenden sulfatierten Formen zeigen eine 2 – 6 fach höhere inhibitorische Stärke der Sulfatgruppe an Position 3 (R^1) des Steroidgerüsts gegenüber einer Hydroxygruppe. Die sekundären Gallensäuren Hyocholat und Hyodeoxycholol besitzen eine zusätzliche Hydroxygruppe an Position 6 (R^2), welche den inhibitorischen Effekt um das 17 – 87-fache vermindert und somit Gallensäuren mit vier Hydroxygruppen als Inhibitoren mit der niedrigsten Potenz aller Gallensäuren identifiziert (IC_{50} von Hyocholat: 971,8 μM). Folgendes inhibitorisches Muster lässt sich an Position 7 (R^3) feststellen, angefangen mit der höchsten und mit der niedrigsten endenden, inhibitorischen Wirkung: H (Lithocholat) \approx (7 α) OH (Chenodeoxycholol) > O (7-Ketolithocholat) > (7 β) OH (Ursodeoxycholol). Eine signifikante Abnahme der Inhibition wird durch eine Hydroxygruppe an Position 12 (R^4) erreicht (Beispiel: Chenodeoxycholol im Vergleich zu Cholol).

Während eine Substitution durch Glycin an Position 25 (R^5) keine bemerkenswerte Veränderung impliziert, zeigt eine Substitution an selbiger Stelle durch Taurin, bis auf Taurochenodeoxycholol, eine Erhöhung der inhibitorischen Stärke. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass 3 α -Monohydroxyl-Gallensäuren und Gallensäuren mit einer Sulfatgruppe an Position 3 die stärkste Inhibition des Transports von SOAT aufweisen.

Tab. 4.9: Inhibitorische Wirkung von Gallensäuren auf den Transport von [³H]DHEAS durch SOAT. Der Na⁺-abhängige Transport von 200 nM [³H]DHEAS wurde in Gegenwart der jeweiligen Gallensäure in Konzentrationen von 100 nM bis 100 µM bzw. 1000 µM gemessen. Für die Berechnung der IC₅₀-Werte wurde die Aufnahme der Flp-In Kontrollzellen auf 0 %, die Aufnahme der SOAT-HEK293-Zellen als Positivkontrolle minus der Negativkontrolle auf 100 % gesetzt.



Bile acid	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	IC ₅₀ (µM)
Cholat	OH	H	OH	OH	OH	177,6
Chenodeoxychololat	OH	H	OH	H	OH	11,2
Ursodeoxychololat	OH	H	OH (β)	H	OH	384,8
Deoxychololat	OH	H	H	OH	OH	100,1
Lithocholat	OH	H	H	H	OH	10,4
7- Ketolithocholat	OH	H	O	H	OH	164,2
Lithocholat-3-sulfat	OSO ₃ H	H	H	H	OH	4,2
Hyocholat	OH	OH	OH	H	OH	971,8
Hyodeoxychololat	OH	OH	H	H	OH	172,6
Glychololat	OH	H	OH	OH	NHCH ₂ CO ₂ -	284,8
Glycodeoxychololat	OH	H	H	OH	NHCH ₂ CO ₂ -	46,7
Glycochenodeoxychololat	OH	H	OH	H	NHCH ₂ CO ₂ -	26,6
Glycoursodeoxychololat	OH	H	OH (β)	H	NHCH ₂ CO ₂ -	100,8
Taurochololat	OH	H	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ -	65,3
Taurodeoxychololat	OH	H	H	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ -	76,3
Taurochenodeoxychololat	OH	H	OH	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ -	38,1
Tauroursodeoxychololat	OH	H	OH (β)	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ -	49,6
Taurolithocholat	OH	H	H	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ -	3,0
Taurolithocholat-3-sulfat	OSO ₃ H	H	H	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ -	0,5

Die Steroidstruktur der Gallensäuren zeigt eine cis-trans-trans Konformation der benachbarten Ringe A-D, bei der in räumlicher Ansicht der erste Ring deutlich abknickt. Im Gegensatz dazu weisen Steroidhormone eine trans-trans-trans Konformation der A-D Ringe auf. Deshalb untersuchten wir als nächstes Steroidhormone und chemische Substanzen mit dieser räumlichen Anordnung (Tab. 4.10). Interessanterweise konnte nur bei wenigen dieser getesteten Substanzen eine signifikante Inhibition festgestellt werden. Nicht überraschend zeigten bekannte Substrate von SOAT, E₁S und PREGS eine kompetitive Hemmung der SOAT-abhängigen DHEAS-Aufnahme. Auch die sulfatierten Steroidhormone Estradiol-3-sulfat und Estradiol-3,17-disulfat hemmten mit IC₅₀-Werten von 145,9 µM und 133,2 µM.

Während Cortisol mit einer Hydroxylgruppe an Position 11 zu keiner Inhibition der SOAT vermittelten DHEAS-Aufnahme führte, zeigte Cortison mit der charakteristischen Ketongruppe an dieser Position eine deutliche Inhibierung und somit deren wichtige Rolle an. Schließ-

lich stellte sich noch das Herzglycosid Digitonin mit seiner cis-trans-cis Andordnung der Steroidringe als guter Inhibitor heraus, nicht jedoch das strukturverwandte Digitoxigenin.

Tab. 4.10: Inhibitorische Wirkung von Steroidhormonen und Substanzen mit Steroidstruktur auf den Transport von 200 nM [³H]DHEAS durch SOAT.

Steroide	IC ₅₀ (µM)	Steroide	IC ₅₀ (µM)
Estron-3-sulfat	22,1	Androstendion	>1000
Pregnenolon-3-sulfat	9,1	Androsteron	>1000
Estradiol-3-sulfat	145,9	Progesteron	>1000
Estradiol-3,17-disulfat	133,2	Testosteron	>1000
Estron	>1000	Dihydrotestosteron	>1000
Estradiol	>1000	DHEA	>1000
Estriol	1000	Methandrostenolon	>1000
Ethinylestradiol	900	Dexamethason	>1000
Estron-3β-D-glucuronid	>1000	Prednisolon	>1000
Corticosteron-21-sulfat	323,8	Prednison	>1000
Deoxycorticosteron-21-glucosid	>1000	Digitonin	4,1
Cortison	29,6	Digitoxigenin	>1000
Cortisol	>1000	Finasterid	>1000
Corticosteron	>1000	Wortmannin	>1000
Aldosteron	>1000	Cholesterol-3-sulfat	>1000

Zusätzlich wurden Hemmstudien mit 2-Sulfooxymethylfurfural, Hydroquininsulfat, Ethylsulfat, Chondroitinsulfat B, Tamsulosin, Ascorbinsäure, Natriumthioglycolat, Glutathion, Enalapril, Genistein, Histamin und Probenecid durchgeführt. Diese zeigten jedoch keine Hemmung. Flutamid, dessen aktiver Metabolit 2-Hydroxyflutamid einen nicht-steroidalen Androgenrezeptorantagonist darstellt, zeigte einen IC₅₀-Wert von 203,9 µM. Als gute Inhibitoren erwiesen sich 4-SMP, ein Substrat von SOAT, mit einem IC₅₀-Wert von 0,8 µM, 2-SMP mit 3,5 µM und α-Naphthylsulfat mit 11,1 µM.

Darüber hinaus wurde die Inhibition von Betulinderivaten getestet. Betuline sind Triterpene mit fünf Kohlenwasserstoffringen (s. Abb. 4.37). Große Mengen dieser Substanzen finden sich z.B. im Birkenkork. Die Derivate EMe I 4 und SAL-II-68 demonstrierten gute Hemmeigenschaften für SOAT mit IC₅₀-Werten von 5,4 bzw. 3,6 µM. Zwei weitere Betulinderivate, JPE 15B und SAL-II-156 inhibierten die DHEAS-Aufnahme moderat, die restlichen getesteten zeigten keine Inhibition (Tab. 4.11).

Tab. 4.11: Inhibitorische Wirkung von Betulinderivaten auf den Transport von 200 nM [³H]DHEAS durch SOAT.

Betulinderivate	Chemische Formel	M.W. (g/mol)	IC₅₀ (μM)
PBel-84b	C34H54O5	542,8	>1000
THE 45	C38H57N3O6	651,9	>1000
EMe I 4	C30H46O3	454,7	5,4
EMe 2	C40H62O6	638,9	>1000
EMe 8	C38H52O5	588,4	>1000
JPE 15B	C48H66O4	707,1	81,2
JPE-33	C30H50O2	442,7	>1000
SAL-II-68	C30H48O3	456,7	3,6
SAL-II-101	C32H52O3	484,8	>1000
SAL-II-138B1	C30H48N2O2	468,7	>1000
SAL-II-138B2	C30H49NO2	455,7	>1000
SAL-II-156	C30H48O3	456,7	66,9

4.4.3 Erstellen der SOAT-Pharmakophore

Für die Erstellung des SOAT-Pharmakophormodells mit gemeinsamen Charakteristika wurden 25 Substanzen aus mehreren unterschiedlichen chemischen Klassen mit minimalen Variationen ausgesucht. Dieses sogenannte „*training set*“ umfasste mit Werten von 150 nM bis 1000 μM einen sehr großen Bereich an IC₅₀ Bestimmungen von ca. fünf Zehnerpotenzen (Tab. 4.12).

Abb. 4.37 veranschaulicht die chemischen Strukturen der für das *training set* verwendeten Substanzen, zusätzliche Strukturen wurden bereits in Tab. 4.9 gezeigt. Abgesehen von den bereits gezeigten Ergebnissen der Gallensäuren und Steroide wurden zusätzlich Propanolamin, Benzothiazepine, Barbiturate, Betuline und weitere Gallensäureanaloge auf Inhibition des Transports von DHEAS durch SOAT getestet (Abb. 4.44).

Tab. 4.12: Training set des SOAT-Pharmakophormodells

Training set (Substanzen)	IC ₅₀ (μM) vorhergesagte Werte	IC ₅₀ (μM) gemessene Werte
S 0960	0.077	0.15
Taurolithocholat-3-sulfat	0.64	0.5
S 1647	2.2	1.1
BSP	17	3.6
SAL-II-68	11	3.6
EMe I 4	16	5.4
Lithocholat	21	10.4
S 9202	36	18.7
S 9086	23	23.1
RR Scymnolsulfat	50	23.3
Cortison	280	29.6
L-Thyroxin	250	49.5
Tauroursodeoxychol	32	49.6
S 9087	38	50
Taurochol	79	65.3
SAL-II-156	16	66.9
Deoxychol	83	100.1
7-Ketolithocholat	110	164.2
Cholat	76	177.6
4-Methylumbelliferylsulfat	1400	255.7
Ursodeoxychol	130	384.8
Hyochol	200	971.8
Cholesterol-3-sulfat	430	>1000
Cortisol	1000	>1000
Wortmannin	4700	>1000

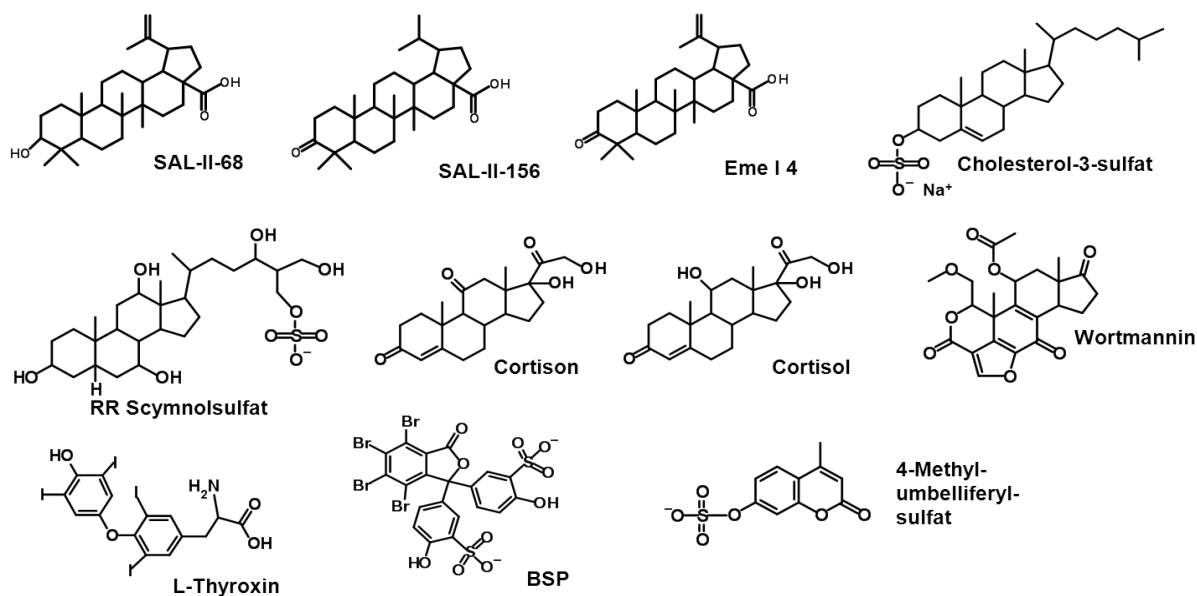


Abb. 4.37: Darstellung der chemischen Strukturen, welche als „training set“ (s. Tab. 4.12) für die Erstellung des SOAT-Pharmakophormodells verwendet wurden.

Die beste Hypothese für eine mit dem Programm CATALYST berechnete SOAT-Pharmakophore zeigt Abb. 4.38. Sie besteht aus drei hydrophoben Bereichen und zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren. In Abb. 4.39 ist zusätzlich die Korrelation zwischen den experimentell ermittelten und den *in silico* berechneten inhibitorischen Aktivitäten mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,89$ dargestellt, ein Wert, der eine gute Vorhersagefähigkeit für die aktuelle Hypothese des SOAT-Pharmakophors verspricht. Dies bestätigt das Resultat, dass die den SOAT-Transport stark inhibierende Gallensäure Taurolithocholat-3-sulfat (TLCS) mit einem IC_{50} -Wert von $0,5 \mu M$ kartographisch alle fünf möglichen Merkmale des Pharmakophormodells erfüllt (Abb. 4.40). Die Abbildung offenbart die unmittelbare Nähe von zwei hydrophoben Regionen an den Methylgruppen 18 und 21. Ein hydrophober Bereich stimmt mit dem abgeknickten *cis* A-Ring des Steroidgerüsts überein. Sowohl das Sulfat an Position 3 als auch die Sulfonylgruppe der Taurinseitenkette agieren als Wasserstoffbrückenakzeptoren. Die Substanzen BSP und S 1647, die beide einen leicht höheren IC_{50} -Wert aufzeigen, also eine etwas niedrigere inhibitorische Aktivität als TLCS besitzen, erfüllen vier der fünf erforderlichen Charakteristika des SOAT-Pharmakophormodells. Während BSP nicht die Anforderungen eines zweiten Wasserstoffbrückenakzeptors erfüllt (Abb. 4.41), zeigt S 1647 die fehlende Übereinstimmung einer hydrophoben Region (s. Abb. 4.42).

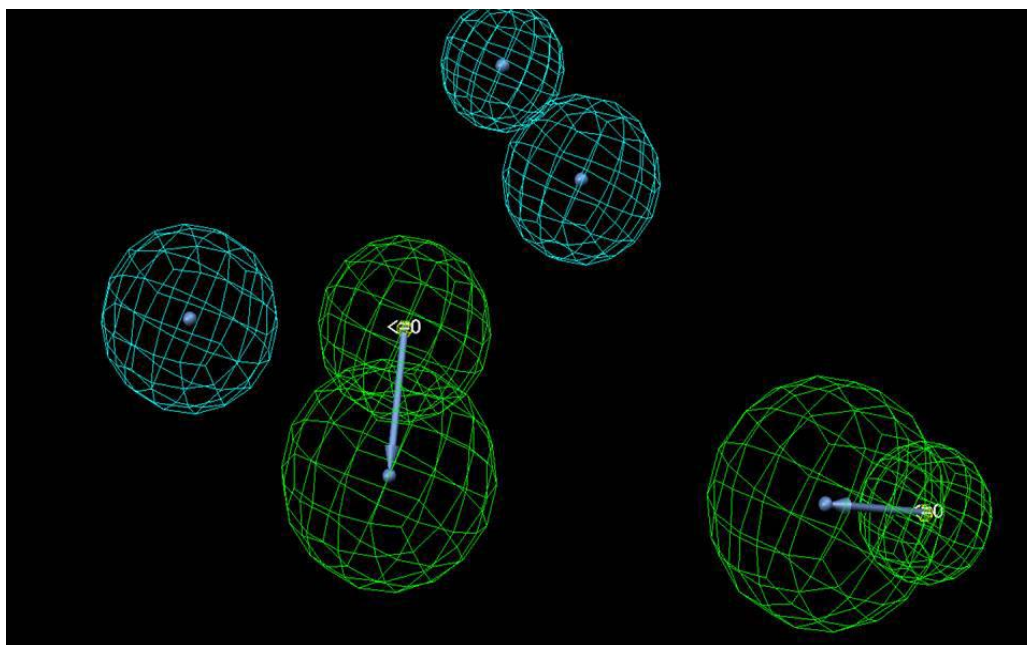


Abb. 4.38: Pharmakophormodell des humanen SOAT. Die drei hydrophoben Bereiche sind als hellblaue Sphären dargestellt. Jeder der beiden Wasserstoffbrückenakzeptoren ist in der Farbe grün durch zwei orbitale Regionen angezeigt, die durch einen Pfeil verbunden sind. Die Richtung der Pfeile zeigt die Position eines akzeptierten Wasserstoffs an, während der Ursprung des Pfeils die Position des Wasserstoffbrückenakzeptors darstellt. Das Pharmakophoren-Modell wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Baringhaus (Sanofi, Frankfurt am Main) generiert.

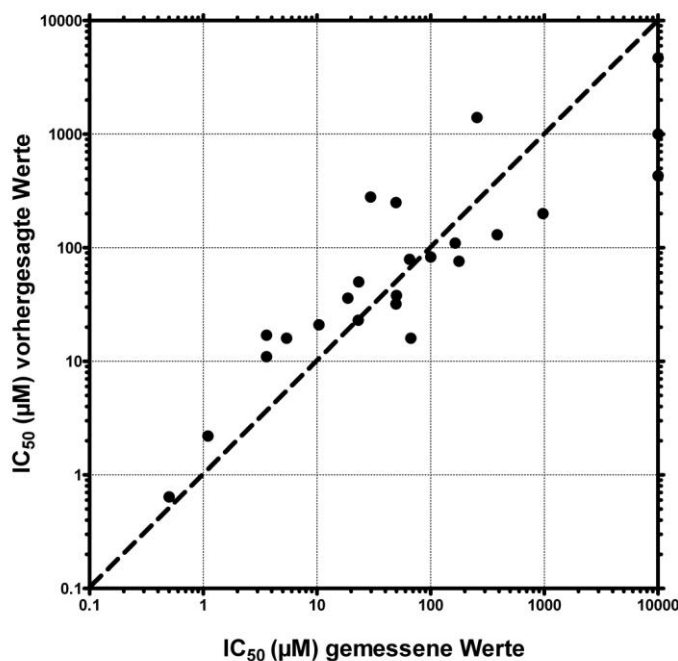


Abb. 4.39: Korrelation der *in silico* geschätzten IC_{50} -Werte (μM) im Vergleich zu den experimentell ermittelten Werten der Substanzen des *training set* auf Grundlage der berechneten Pharmakophore. Die Abbildung demonstriert die Korrelation nach Ermittlung der statistisch signifikantesten Hypothese des Pharmakophormodells zwischen den experimentell ermittelten und vom Computer berechneten, vorhergesagten IC_{50} -Werte mit einem Korrelationskoeffizient von $r = 0,89$, berechnet mit CATALYST. Die x-Achse zeigt die experimentell ermittelten IC_{50} -Werte (Werte über $1000 \mu M$ wurden auf $10000 \mu M$ gesetzt), die y-Achse die *in silico* geschätzten IC_{50} -Werte an.

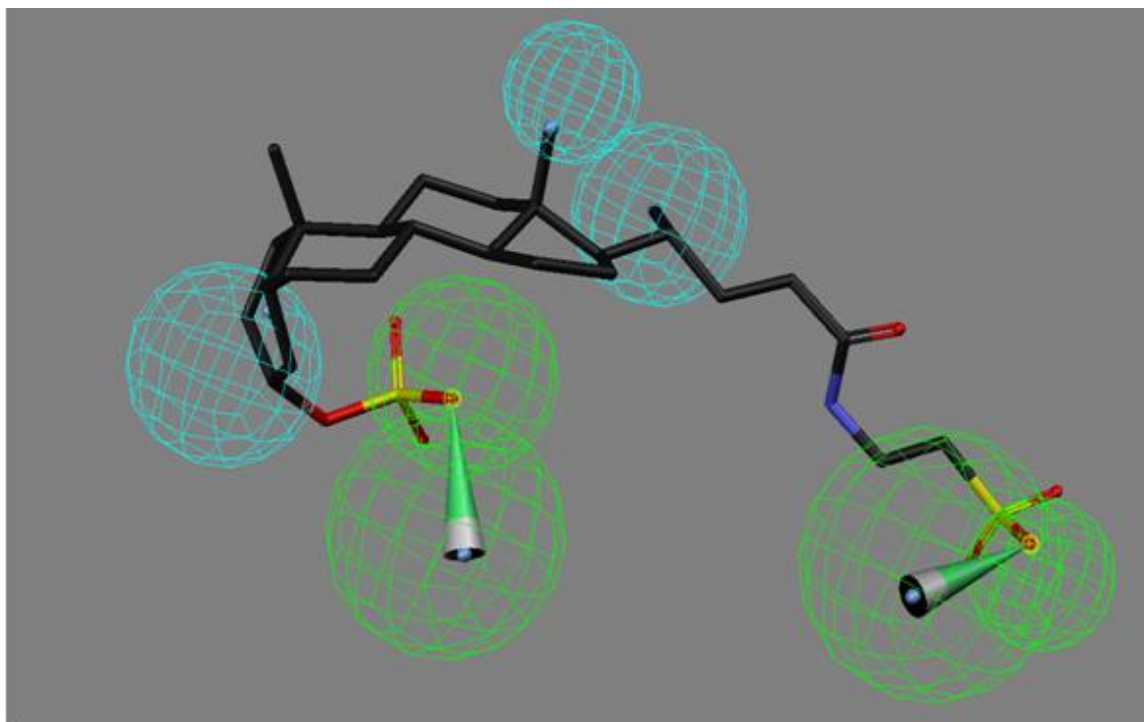


Abb. 4.40: Die Gallensäure Taurolithocholat-3-sulfat (TLCS), eingefügt in das SOAT-Pharmakophormodell. Alle fünf elementaren Eigenschaften werden von TLCS abgedeckt; zwei benachbarte hydrophobe Gruppen an der Methylgruppe 18 bzw. 21 und eine hydrophobe Gruppe am A-Ring (hydrophobe Gruppen in hellblauer Farbe); die elektronegative Sulfatgruppe an Position 3 und Sulfonylgruppe des Taurins fungieren als Wasserstoffbrückenakzeptoren.

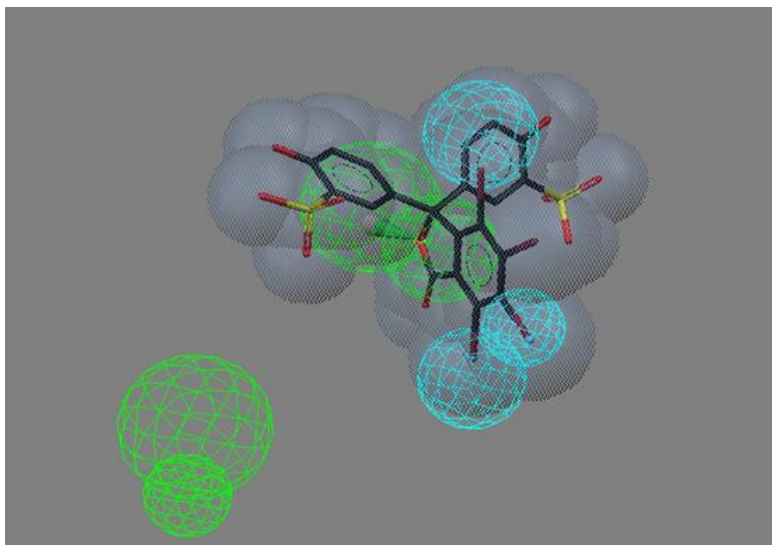


Abb. 4.41: BSP eingefügt in das SOAT-Pharmakophormodell.

Die drei hydrophoben Gruppen (hellblau) stimmen überein, genau wie ein Wasserstoffbrückenakzeptor (hell-grün). Ein Wasserstoffbrückenakzeptor bleibt unbesetzt.

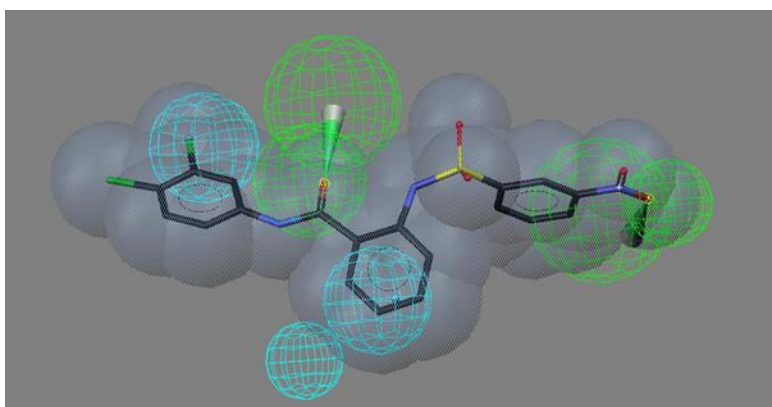


Abb. 4.42: S 1647 eingefügt in das SOAT-Pharmakophormodell.

Zwei hydrophobe Gruppen (hellblau) und beide Wasserstoffbrückenakzeptoren werden besetzt, eine hydrophobe Gruppe bleibt unbesetzt.

4.4.4 Validierung der SOAT-Pharmakophorhypothese

Zunächst wurde zur Validierung der generierten Hypothese eines SOAT-Pharmakophormodells eine Datenbank nach Substanzen durchforstet, die die Anforderungen der Hypothese mit den fünf Charakteristika erfüllen. Insgesamt wurden 67360 Treffer angezeigt. Nach Anwendung einer Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung der Charakteristika von über 50 % verblieben 3437 Treffer. Diese Anzahl konnte durch eine erneute Suchanfrage mit Restriktion auf die Form von TLCS (auch Shape-Anfrage genannt) drastisch auf 180 Treffer reduziert werden. Eine parallel laufende Suchanfrage mit der Restriktion auf die sphärische Gestalt von S 1647 begrenzte die Anzahl der Treffer auf 75, eine auf der sphärischen Gestalt von BSP basierende Suchanfrage lieferte keine Ergebnisse. Für die Validierung der SOAT-Pharmakophore wurden neun Substanzen mit niedrigen IC_{50} -Werten aus den beiden Ergebnislisten für TLCS oder S 1647 ausgesucht und experimentell bestimmt (s.Tab. 4.13, Abb. 4.43). Jedoch zeigten nur drei Substanzen eine Inhibition des SOAT-Transports von DHEAS und wurden daraufhin, wegen eines Vergleichs der Pharmakophoren von SOAT und

dem cAsbt/ASBT (Kap. 4.4.5) auch auf die Fähigkeit untersucht, den TC-Transport von ASBT zu hemmen. Diese zeigten keine inhibitorische Aktivität für ASBT bei Konzentrationen bis 1000 μM .

Tab. 4.13: Validierung des SOAT-Pharmakophormodells (1)

<i>Training set</i> (Substanzen)	Shape- Anfrage	IC_{50} (μM) geschätzt SOAT	IC_{50} (μM) gemessen SOAT	IC_{50} (μM) gemessen ASBT
T 5332717	S 1647	1.04	>1000	
T 5244339	TLCS	0.85	>1000	
T 5361670	TLCS	0.81	>1000	
T 5484220	TLCS	1.50	1000	
T 5421128	TLCS	0.98	1000	
T 5497238	TLCS	1.07	200	
T 5239532	TLCS	0.83	137	>1000
T 5573915	S 1647	1.43	57	>1000
T 5854015	S 1647	1.28	9	>1000
T 0511-1698	S 1647 und TLCS	15	15	350

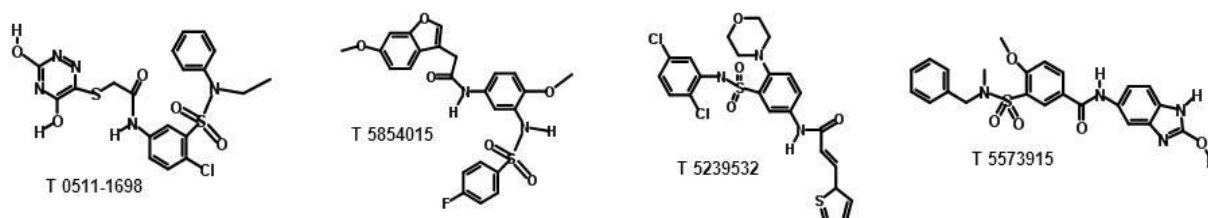


Abb. 4.43: Chemische Strukturen der für die Validierung der SOAT-Pharmakophore verwendeten Substanzen. Nach Generierung der SOAT-Pharmakophore mit dem *training set* (Tab. 4.12) wurden dargestellte Substanzen *in silico* als potente SOAT-Inhibitoren vorhergesagt (Tab. 4.13). Diese Substanzen wurden auch auf eine mögliche ASBT-Inhibition hin untersucht.

Wegen des unzureichenden Ergebnisses wurde eine ursprüngliche Substanzsuche basierend auf einer Überschneidung der Formen von TLCS und S 1647 durchgeführt. Dies begrenzte die Anzahl der Treffer in der Datenbank auf vier Substanzen. Eine davon, T 0511-1698, war erhältlich und wurde auf Inhibition getestet, wobei der vorhergesagte IC_{50} -Wert von 15 μM exakt mit dem experimentell ermittelten Wert übereinstimmte (Tab. 4.13).

4.4.5 Vergleich der IC₅₀-Werte des *training set* von cASBT und SOAT

Ein Pharmakophormodell des Asbt vom Kaninchen (cAsbt) wurde bereits erstellt, charakterisiert durch einen Wasserstoffbrückendonator, einen Wasserstoffbrückenakzeptor und drei hydrophobe Bereiche (Kap. 5.4.3, Baringhaus et al. 1999). Wegen der hohen Aminosäuresequenzidentität zwischen SOAT und ASBT wurden 14 Substanzen des *training set*, die für die Erstellung der cAsbt-Pharmakophore benutzt wurden, zum Vergleich auf eine eventuelle SOAT-Inhibition getestet (Abb. 4.44).

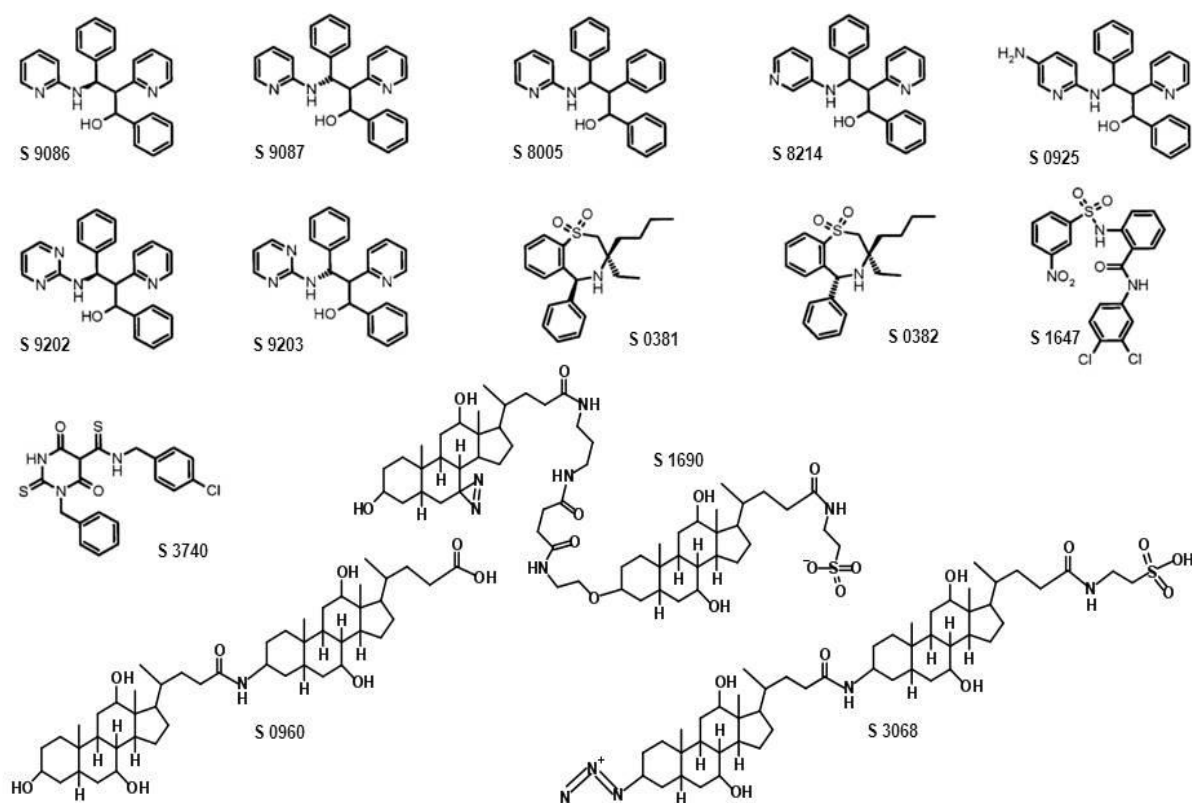


Abb. 4.44: Chemische Strukturen von Substanzen, die als *training set* für die Erstellung der 3D-QSAR cAsbt-Pharmakophore verwendet wurden und auch auf SOAT-Inhibition getestet wurden. Diese Substanzen standen durch eine Kooperation mit Prof. Dr. Dr. Werner Kramer zur Verfügung.

Ein Vergleich der Ergebnisse deutet auf eine Korrelation mit einem berechneten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,54$ und $p = 0,04$ hin (Tab. 4.14, Abb. 4.45). Da die Autoren der cAsbt-Pharmakophore die Gallensäure TC in ihr Modell eingefügt hatten, konnte dieser mit dem SOAT-Modell mit eingefügtem TLCS verglichen werden (Kap. 5.4.3). Dabei wurde eine gewisse Ähnlichkeit beider Pharmakophoren festgestellt.

Tab. 4.14: Vergleich der IC_{50} -Werte zwischen cAsbt und SOAT mit den zur Erstellung der cAsbt-Pharmakophore verwendeten Substanzen (in μM).

<i>Training set</i> (Substanzen)	IC_{50} cAsbt	IC_{50} SOAT	<i>Training set</i> (Substanzen)	IC_{50} cAsbt	IC_{50} SOAT
S 9087	0,3	50	S 0925	16	1000
S 9203	1	37,7	S 1690	20	0,7
S 0382	3	75,2	S 0960	30	0,15
S 1647	4	1,1	S 9202	90	18,7
S 3068	4	1	S 0381	700	1000
S 8214	4	14,9	S 9086	1500	23,1
S 3740	8	1,1	S 8005	3000	1000

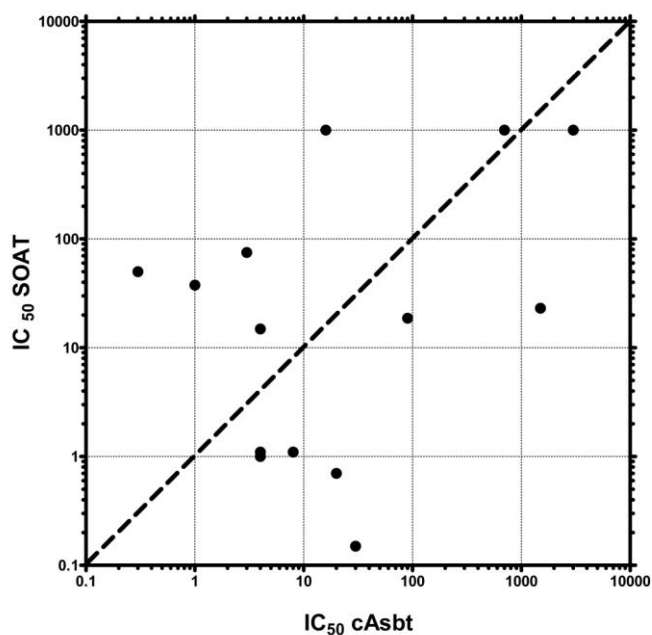


Abb. 4.45: Korrelation der gemessenen IC_{50} -Werte (μM) mit den Substanzen aus Tab. 4.14 und Abb. 4.44. Für ASBT (x-Achse) und SOAT (y-Achse) wurden die IC_{50} -Werte eingetragen; der berechnete Korrelationskoeffizienten beträgt $r = 0.54$ mit $p = 0.04$. Die gestrichelte Linie zeigt die Winkelhalbierende.

4.4.6 Stimulierende Effekte

Bei der Bestimmung der IC_{50} -Werte zeigten einige Substanzen bei steigenden Konzentrationen eine Stimulierung der Natrium-abhängigen DHEAS-Aufnahme durch SOAT. Für eine Gruppe von Substanzen konnte eine konzentrationsabhängige Stimulierung ohne einen zusätzlichen inhibierenden Effekt bei hohen Konzentrationen festgestellt werden. Für die Androgene Testosteron und Androstendion und die Glukokortikoide Cortisol, Prednisolon und Prednison wurde die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293-Zellen auf ca. 200 % gesteigert (Abb. 4.46). Auch Tamoxifen, ein selektiver Estrogenrezeptormodulator, steigerte den Transport in die Zellen um fast das Doppelte.

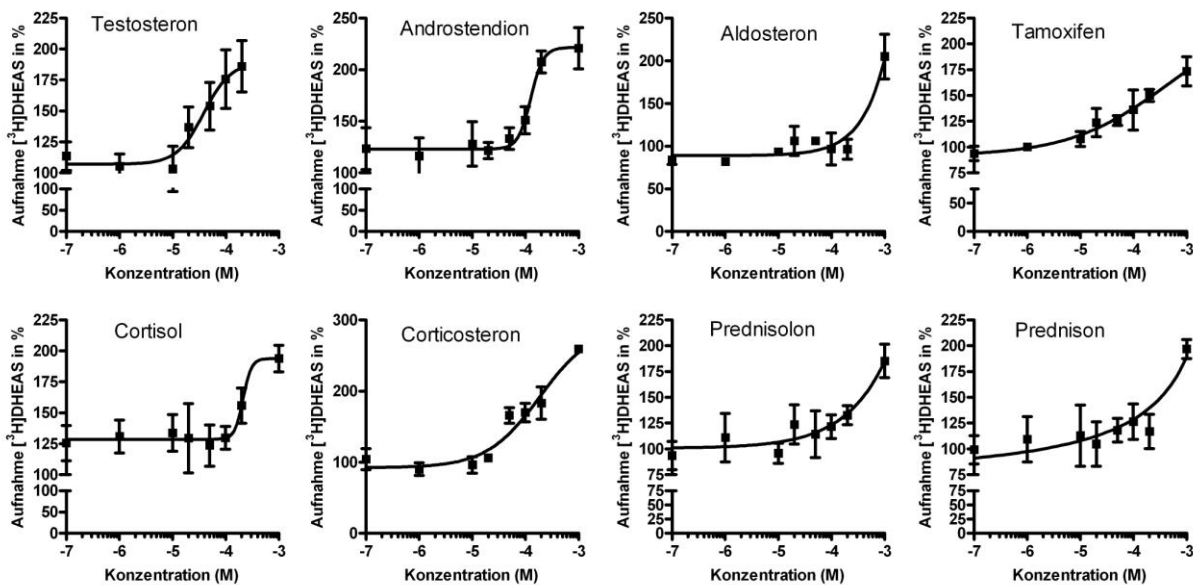


Abb. 4.46: Stimulierender Effekt von Substanzen auf die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293-Zellen. Natrium-abhängige Aufnahme von DHEAS wurde je nach Löslichkeit bei Konzentrationen von 100 nM bis 1000 μ M gemessen. Mit Transportpuffer inkubierte Zellen dienten als Positivkontrolle, FlpIn-HEK293-Zellen als Negativkontrolle. Balken zeigen MW \pm SD an.

Eine weitere Gruppe von stimulatorisch aktiven Substanzen zeigte nach einer konzentrationsabhängigen Stimulation eine folgende Inhibition bzw. Wiederabnahme der DHEAS-Aufnahme bei hohen Konzentrationen (Abb. 4.47). Die beiden Substrate von SOAT, E_1S und PREGS, stimulierten im Gegensatz zu allen anderen stimulierenden Substanzen die DHEAS-Aufnahme in die SOAT-HEK293-Zellen statistisch signifikant bereits bei einer niedrigen Konzentration von 1 μ M. Bei Konzentrationen höher 1 μ M fand dagegen eine kompetitive Hemmung statt. Die sekundäre Gallensäure Hyodeoxycholsäure (HDCA) zeigte von allen Substanzen den höchsten stimulierenden Effekt mit einer Zunahme auf fast 300 % der normalen DHEAS-Aufnahme bei einer Konzentration von 20 μ M. Ebenfalls Wortmannin (ein

Mykotoxin und Inhibitor der Phosphoinositid-3-kinase), Flutamid (ein Antiandrogen, welches als Zytostatikum beim Prostatakarzinom angewandt wird) und schließlich STX64 (ein potenter irreversibler Inhibitor der Steroidsulfatase) zeigten eine Stimulation mit wieder abfallenden Transportraten bei Konzentrationen über 100 bzw. 200 μM . Ferner stieg bei Progesteron, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und 3β -Androstenon-Dehydroisoandrosteron die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293-Zellen auf fast das Doppelte an, aber auch trotz wieder absinkender Werte konnte keine Hemmung von unter 100 % herbeiführt werden. Natriumethylsulfat zeigte eine statistisch signifikante Stimulierung des Transports bei 20 μM , jedoch nur mit einer Zunahme von ca. 30 %.

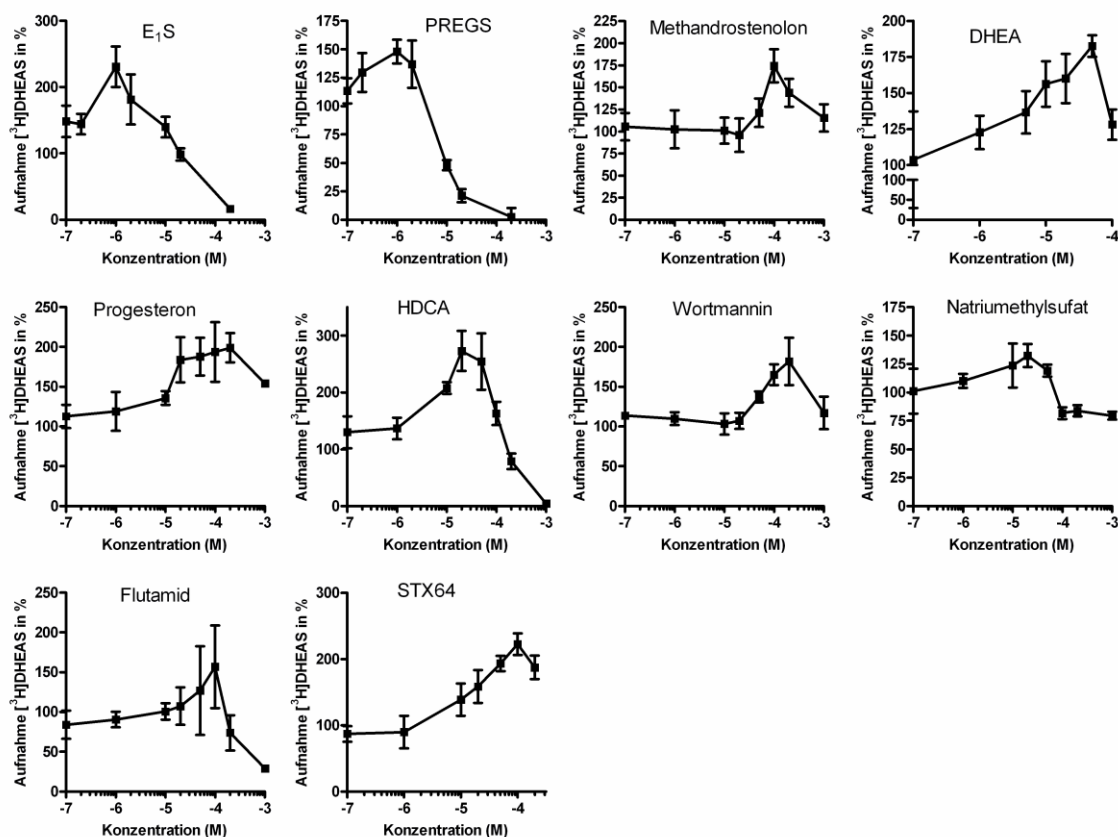


Abb. 4.47: Stimulierender Effekt von Substanzen auf die DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293-Zellen mit nachfolgender Wiederabnahme bzw. Inhibition. Natrium-abhängige Aufnahme von DHEAS wurde je nach Löslichkeit bei Konzentrationen von 100 nM bis max. 1000 μM gemessen. Mit Transportpuffer inkubierte Zellen dienen als Positivkontrolle, FlpIn-HEK293-Zellen als Negativkontrolle. Die Balken zeigen MW \pm SD an.

5 DISKUSSION

5.1 Charakterisierung des mSoat

Ein großer Teil dieser Doktorarbeit beschäftigt sich mit der molekularen und funktionellen Charakterisierung des mSoat. Ziel war von Anfang an, diesen mit dem humanen SOAT zu vergleichen, da die Generierung einer mSoat-*knockout* Maus angedacht ist. Dabei ist die Übertragbarkeit der Daten von der Maus auf den Menschen ein entscheidender Faktor. Der humane SOAT wurde bereits weitgehend molekularbiologisch und zellbiologisch charakterisiert (Geyer et al. 2007), so dass die Voraussetzungen für einen Vergleich zum murinen Soat zu Beginn dieser Arbeit gegeben waren.

5.1.1 Sequenzanalyse, Membrantopologie und *in silico* Promotoranalyse von mSoat und SOAT im Vergleich

Beide Gene weisen 6 codierende Exone mit vergleichbaren Exon- und Introngrößen auf (Abb. 5.1) und auch die Eingruppierung in die SLC10-Familie von SOAT und mSoat ähnelt sich sehr. SOAT zeigt beim Vergleich der Aminosäuresequenzen die höchste Sequenzidentität zu ASBT mit 41,8 % und 33,4 % zu NTCP. mSoat hat zum Asbt der Maus sogar eine 46 %ige Sequenzidentität, zum Ntcp der Maus sind es 34,5 %. Ein Aminosäuresequenzalignment mit 71 %-iger Identität zwischen mSoat und SOAT (Abb. 4.1) offenbart die größten Differenzen im N- und C-terminalen Bereich. Eine Analyse bioinformatischer Programme auf Basis der Hydrophobizität schlägt für den mSoat ein Modell von 6 bis 9 Transmembrandomänen (TMD) vor. Die meisten Programme, insgesamt zehn, unterstützen hierbei ein neun TMD-Modell, ein sieben TMD-Modell präferieren sieben Programme. Für den humanen SOAT wurde gezeigt, dass drei Programme (HMMTOP, MEMSAT3, PredictProtein) ein neun TMD-Modell und nur ein Programm ein sieben TMD-Modell (Toppred mit *KD-scale*) bevorzugen, die meisten Programme (TMAP, PSORT II, CONPRED II, MEMASAT, TMHMM, TMPred, Toppred/GES-scale, SOSUI) jedoch ein acht TMD-Modell (Döring, Dissertation 2010). Durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen am SOAT-Protein konnte eine extrazelluläre Lokalisation des N-Terminus und eine intrazelluläre Lokalisation des C-Terminus bewiesen werden (Geyer et al. 2007), was für eine ungerade Anzahl von TMDs spricht und somit ein acht TMD-Modell ausschließt. Für den ASBT und NTCP mit den höchsten Sequenzidentitäten zum SOAT wurde bisher ein sieben TMD-Modell mit extrazellulärem N- und intrazellulärem C-Terminus angenommen (Stieger et al. 1994; Hallén et al. 1999; Kramer et al. 2001a; Hallén et al. 2002a,b; Zhang et al. 2004; Mareninova et al. 2005; Banerjee und Swaan 2006). Erst kürzlich wurde jedoch von der Kristallstruktur eines bakteriellen Homologs

des humanen ASBT, dem sog. Asbt_{NM}, mit 10 TMD und zytoplasmatischem N- und C-Terminus berichtet (Hu et al. 2011).

Bei den SLC10-Transportern von Vertebraten, die einen kürzeren N-Terminus mit extrazellulärer Lokalisation aufweisen (Zhang et al. 2004; Hallén et al. 1999; Banerjee und Swaan 2006; Geyer et al. 2007), wird das erste TMD des Asbt_{NM} von den bioinformatischen Programmen nicht erkannt. Bei Vertebraten ist daher ein 9 TMD-Modell der Proteinstruktur wahrscheinlich (Hu et al. 2011).

Die *in silico* Promotoranalyse (Tab. 4.2) ergab eine hoch konservierte AR-Bindungsstelle auf dem Minusstrang sowie eine GR-Bindungsstelle auf dem Plusstrang der angeglichenen Sequenzen von mSoat und SOAT. Die ermittelten Konsensussequenzen beider Bindungsstellen zeigen eine signifikante Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten (Bolton et al. 2007; Claessens et al. 2001; So et al. 2007). Jedoch bedarf es einer Validierung durch einen Luciferase-Reporterassay, der die zelluläre Aktivität der nuklearen Rezeptoren in Säugerzellen misst und im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt wird.

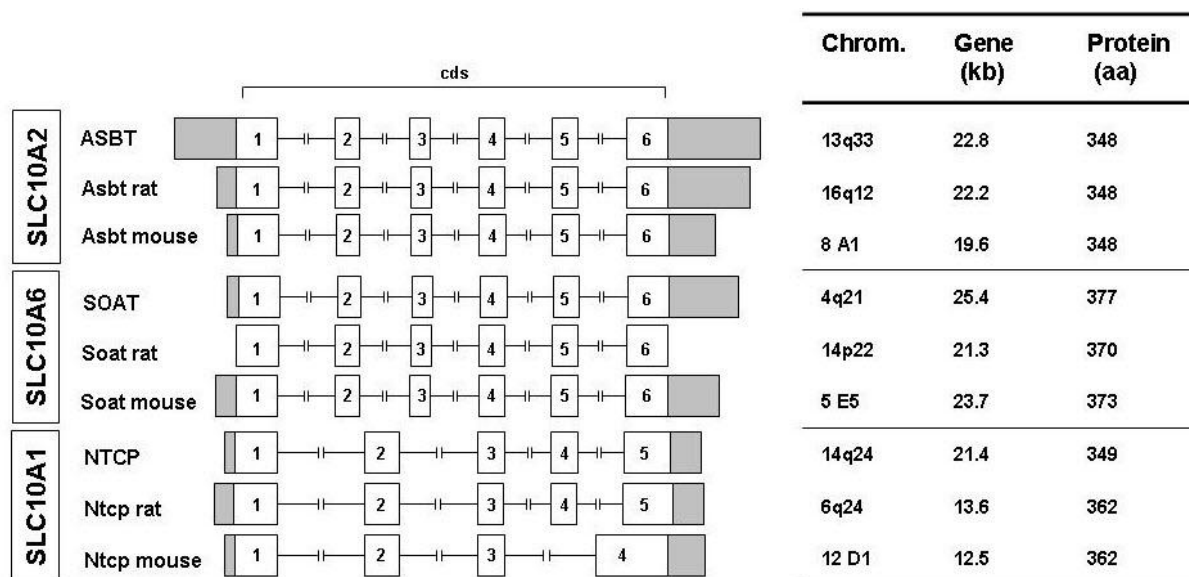


Abb. 5.1: Genomische Organisation der SLC10 Transporter ASBT, SOAT und NTCP von Mensch, Ratte und Maus. Die 5' und 3' UTR sind grau markiert, die Exone als Kästchen und die Introne als unterbrochene Linie dargestellt (nach Geyer et al. 2006).

5.1.2 Transporteigenschaften und inhibitorisches Profil von mSoat und SOAT im Vergleich

In Übereinstimmung mit den Aufnahmestudien am humanen SOAT zeigt der murine Soat eine Transportaktivität für die sulfokonjugierten Steroidhormone DHEAS, E₁S und PREGS, während Taurocholat nicht in die stabil transfizierten mSoat- und SOAT-HEK293-Zellen aufgenommen wird. SOAT zeigt mit einem K_m-Wert von 28,7 µM und V_{max}-Wert von 1899 pmol/mg Protein/min eine höhere Affinität und Kapazität zu bzw. für DHEAS als mSoat mit einem K_m-Wert von 60,3 µM und V_{max}-Wert von 362,8 pmol/mg Protein/min. E₁S und PREGS ließen eine höhere Affinität zum mSoat mit K_m-Werten von 2,1 µM bzw. 2,5 µM als für den SOAT mit 12 µM bzw. 11,3 µM erkennen (Tab. 5.1).

Wegen des niedrigen K_m-Werts und der hohen Transportrate mit einem Verhältnis von 13,3 gegenüber der Natrium-freien Kontrolle stellt sich für mSoat das PREGS als Substrat mit der höchsten Affinität und Kapazität heraus (Abb. 4.9). Auch für den SOAT zeigt PREGS die höchste Affinität und Kapazität der getesteten sulfatierten Steroidhormone. Allerdings liegt das Verhältnis der Affinitäten von DHEAS zu PREGS beim mSoat bei 1 zu 24; für SOAT sind dies 1 zu 2,5. Dies zeigt, dass SOAT eine höhere Transportaktivität für DHEAS aufweist als mSoat.

Tab. 5.1: Vergleich der Transportkinetiken von [³H]DHEAS, [³H]E₁S, und [³H]PREGS von mSoat und SOAT, die in stabil transfizierten HEK293-Zellen gemessen wurden. Flp-In-HEK293-Zellen wurden als Negativkontrolle benutzt. Michaelis-Menten Kinetik (K_m and V_{max}) wurde durch nicht lineare Regression berechnet. Werte repräsentieren MW ± SD von Dreifachbestimmungen zweier unabhängiger Experimente (n=6). Die Werte für den humanen SOAT wurden aus Geyer et al. 2007 entnommen.

Substrat	mSoat		SOAT	
	K _m (µM)	V _{max} (pmol/mg Protein/min)	K _m (µM)	V _{max} (pmol/mg Protein/min)
DHEAS	60,3 ± 7,8	363 ± 17	28,7 ± 3,9	1899 ± 81
E ₁ S	2,1 ± 0,4	27 ± 1	12,0 ± 2,3	585 ± 34
PREGS	2,5 ± 0,2	377 ± 6	11,3 ± 3,0	2168 ± 134

Die niedrigere Affinität des mSoat zu DHEAS verglichen mit dem humanen SOAT kann eventuell dadurch erklärt werden, dass Ratten und Mäuse nur niedrige zirkulierende Konzentrationen von DHEAS aufweisen (Maninger et al. 2009; Cutler et al. 1978; van Weerden et al. 1992), während DHEAS das Steroidsulfat mit der höchsten Konzentration im menschlichen Körper darstellt (Longcope 1996). DHEAS wird beim Menschen in der Nebenniere und den Keimdrüsen synthetisiert, bei Ratte und Maus jedoch wegen des Fehlens von P450c17 in der Nebenniere nur in den Keimdrüsen (Maninger et al. 2009; Weerden et al. 1992; Le

Gascogne et al. 1991; Perkins und Payne 1988). Im Menschen präferiert die 17,20- Lyaseaktivität des P450c17-Enzyms in bedeutendem Umfang den $\Delta 5$ -Weg [Abb. 5.2 (A)] mit Umsetzung von Pregnenolon zu 17OH-Pregnenolon und weiter zu DHEA (Fluck et al. 2003). Der weitere Metabolismus von DHEA zu Androstendion durch die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) ist der einzige Weg, über welchen der Mensch Androstendion produzieren kann (Conley und Bird 1997). Bei Nagern kann Cholesterin durch zwei Wege, dem $\Delta 5$ - und dem dominierenden $\Delta 4$ -Weg [Abb. 5.2 (B)] umgesetzt werden. Dieser $\Delta 4$ -Weg ist durch eine Umsetzung von Pregnenolon durch die 3β -HSD zu 17OH-Progesteron und schließlich zu Androstendion charakterisiert. Die Speziesunterschiede der vorherrschenden Steroidwege könnten zum Teil die unterschiedlich zirkulierenden Konzentrationen von DHEAS und PREGS erklären.

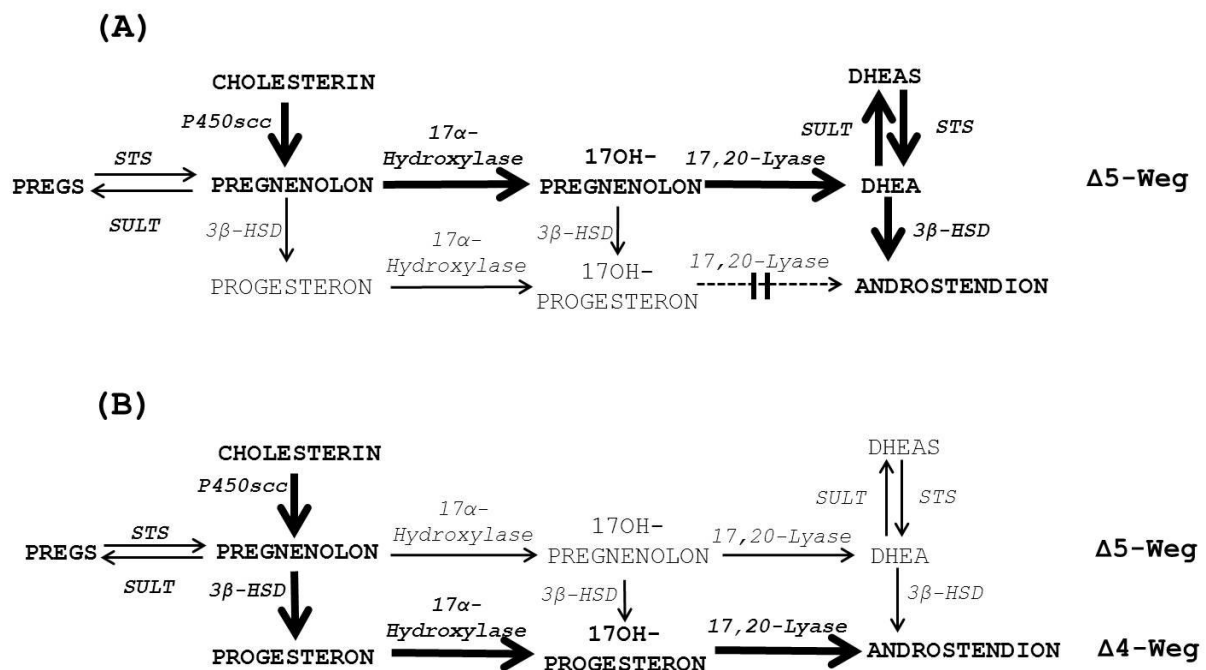


Abb. 5.2: $\Delta 4$ - und $\Delta 5$ - Wege der Steroidhormonsynthese. Beim **Mensch (A)** präferiert die 17,20-Lyaseaktivität des P450c17-Enzyms den $\Delta 5$ -Weg mit Umsetzung von Pregnenolon zu 17-OH-Pregnenolon und weiter zu DHEA. Die Sulfatierung von DHEA zu DHEAS und Pregnenolon zu PREGS erfolgt über die Sulfotransferasen (SULT), die Desulfatierung durch die Steroidsulfatase (StS). DHEA wird durch die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) in Androstendion umgewandelt. Bei **Nagern (B)** wird Cholesterin durch zwei Wege, dem $\Delta 5$ - und dem dominierenden $\Delta 4$ -Weg zu Pregnenolon, Progesteron, 17OH-Progesteron und schließlich zu Androstendion umgesetzt, so dass die Umsetzung zu DHEA/DHEAS kaum eine Rolle spielt (aus Maninger et al. 2009, modifiziert).

Der Vergleich des inhibitorischen Profils zwischen mSoat und SOAT weist große Gemeinsamkeiten auf. Die trihydroxylierten Gallensäuren TC und Cholat sind keine guten Inhibitoren des Transports von PREGS durch mSoat bzw. von DHEAS durch SOAT (Döring, Dissertation 2010). Die $3\alpha,12\alpha$ -dihydroxylierte Gallensäure Glycodeoxycholat zeigte eine merkliche Inhibition bei beiden Transportern. Das $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxylierte Chenodeoxycholat zeigte bei

SOAT eine deutlichere Hemmung als beim mSoat. Als beste inhibitorische Gallensäuren beider Transporter erwiesen sich die monohydroxylierten Gallensäuren TLCS, Lithocholat-3-sulfat und TLC mit nahezu vollständiger Inhibition des Transports. Nicht-steroidale Organosulfate wie 4-SMP, 1 Ω -SEP, BSP und α -Naphthylsulfat reduzierten die Aufnahme sowohl von mSoat als auch SOAT deutlich. 4-SMP, ein Isomer von 1-SMP, ist durch seine kovalente Bindung an DNA eine Substanz von toxikologischer Bedeutung, die Mutationen und Neoplasien herbeiführt (Glatt et al. 2000; Engst et al. 1999). Für 2-SMP und 4-SMP konnte ein Natrium-abhängiger Transport in SOAT-HEK293-Zellen bewiesen werden (Geyer et al. 2007).

Da für die Substanzen des „*training set*“, die zur Erstellung der 3D-QSAR cAsbt-Pharmakophore dienten, auch für den humanen SOAT die IC₅₀-Werte bestimmt wurden (Tab. 4.14) und zusätzlich eine inhibitorische Überprüfung dieser Substanzen am mSoat erfolgte (Abb. 4.13), lässt sich ein Vergleich anstellen. Sowohl bei mSoat als auch SOAT ist eine sehr gute Hemmung für S 1647, S 3068, S 3740, S 1690 und S 0960, bei S 0925, S 0381 und S 8005 dagegen keine Inhibition festzustellen. Dieses beinahe identische Muster zwischen beiden Transportern legt nahe, dass die beteiligten Aminosäuren des mSoat- bzw. SOAT-Proteins, die an der Bindungsstelle zur Substraterkennung, aber auch an der Inhibition beteiligt sind, und somit auch die funktionellen Bereiche beider Pharmakophormodelle, größtenteils übereinstimmen.

5.1.3 Expression von mSoat und SOAT

Die höchste mSoat-Expression zeigte sich bei allen Mauslinien in der Lunge, dicht gefolgt von Hoden in CF-1 und BALB/c Mäusen, während die Expression von mSoat im Hoden bei C57BL/6-J Mäusen viel niedriger war (Abb. 4.4). Eine zusätzliche Validierung mit mehreren C57BL/6-J Mäusen relativierte dieses Ergebnis der festgestellten niedrigen Expression im Hoden jedoch (Abb. 4.5), eventuell ein Befund, der als Aspekt einer biologischen Streuung innerhalb einer Mauslinie angesehen werden kann. Des Weiteren zeigte sich generell eine moderate mSoat-Expression in der Harnblase, im Herz und der Haut. mHprt1 und mB2m, zwei für die Maus empfohlene Kontrollgene (sog. housekeeper) wurden als endogene Kontrolle verwendet (Life Technologies Application Note, 2012). Beide demonstrierten ein ähnliches Expressionsprofil, die größte Varianz zeigte sich im Hoden. Ursache hierfür könnte eine für das humane B2M festgestellte Regulierung durch Androgene sein, die eventuell auch auf mB2m zutrifft (Gross et al. 2007). Daher sollten die Ergebnisse des Expressionsprofils mit mHprt1 als endogene Kontrolle präferiert, und die Resultate mit mB2m als unterstützende Absicherung verstanden werden. Im Gegensatz zum mSoat wurde beim humanen SOAT, verglichen mit der Lunge und allen anderen untersuchten Organen, eine wesentlich höhere Expression im Hoden ermittelt (Geyer et al. 2007). Es muss jedoch bedacht werden, dass für den murinen Soat die gesamte Lunge zur Extraktion von cDNA verwendet wurde, während

für die Expression von SOAT ein cDNA panel (BD Clontech) herangezogen wurde, bei dem das Verhältnis von Alveolar- und Bronchialepithel unbekannt ist. Eine höhere Expression von SOAT in der Lunge kann deshalb erst ausgeschlossen werden wenn, wie für den mSoat, eine Validierung durch mehrere Gewebeproben mit bekanntem Bronchialepithel-Anteil erfolgt.

5.1.4 Physiologische Bedeutung des mSoat/SOAT

Die physiologische bzw. pathophysiologische Relevanz von SOAT und mSoat ist bisher nicht bekannt, aber ein Import von den SOAT- bzw. mSoat-Substraten DHEAS, E₁S und PREGS könnte nach Desulfatierung durch die Steroidsulfatase zur gesamten Androgen-, Estrogen-, und Progesteronproduktion in den relevanten Organen beitragen (Reed et al. 2005; Labrie et al. 2001; Hess et al. 2003).

Die Ergebnisse einer immunhistochemischen Untersuchung sind maßgeblich von der Qualität des Antikörpers abhängig. Die Herstellung des verwendeten affinitätsgereinigten Antikörpers erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen gegen ein C-terminales Epitop des mSoat-Proteins (CYEKQPRETSAFLDKG). Als Negativkontrollen wurden generell Peptidblockierungen, eine Inkubation mit Präimmunserum und eine Inkubation ohne Primärantikörper durchgeführt; alle Kontrollen führten zu einem vollständigen Verlust der Antikörper-spezifischen Färbung. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich immunhistochemische Anfärbungen mit Antiserum durchgeführt. Obwohl alle möglichen Kontrollen durchgeführt wurden, können nur Untersuchungen an mSoat-Knockout Mäusen den finalen Beweis der Spezifität des Antikörpers erbringen.

Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie konnte durch Western Blot-Analyse mit demselben Antikörper im Hodenhomogenat der Maus eine spezifische Bande festgestellt werden. Eine in-situ-Hybridisierung am Hoden des Menschen zeigte eine Lokalisation von SOAT-mRNA in pachytänen primären Spermatozyten. Dieses Ergebnis unterstützt die immunhistochemische Lokalisation des mSoat-Proteins im Mäusehoden. Weitere verifizierende Untersuchungen (Western Blot, in-situ-Hybridisierung) an Hoden, Lunge, Haut und Blase der Maus stehen jedoch noch aus.

5.1.4.1 Lunge

Zur Lokalisation des mSoat in murinem Gewebe wurden immunhistochemische Versuche an Lungenparaffinschnitten durchgeführt. Mit dem mSoat-Antikörper zeigte sich eine spezifische Anfärbung des Zytoplasmas (möglicherweise des Endoplasmatischen Retikulums) von Bronchialepithelzellen der Hauptbronchien bis zu den Bronchioli terminales, nicht aber in den Bronchioli respiratorii und der Lamina propria. Über die physiologische Rolle von sulfatierten

Steroidhormonen in der Lunge ist wenig bekannt, deren Vorkommen konnte jedoch in der humanen Lunge bereits nachgewiesen werden.

In vitro zeigte sich in menschlichem Lungenhomogenat eine Umsetzung von [^3H]E $_1$ S zu Est-ron mit weiterer Metabolisierung zu 17 β -Estradiol, und von [^3H]DHEAS zu DHEA mit weiterer Umsetzung zu Androstendion (Milewich et al. 1983). Außerdem konnte in der Lunge von BALB/c-Mäusen die Steroidsulfataseaktivität bestimmt werden (Milewich et al. 1984). Eine hohe Expression des mAr im Bronchialepithel und Typ II Pneumozyten der murinen Lunge wurde festgestellt und eine Behandlung mit Androgenen erhöhte den Proteinlevel des AR in der Lunge. Wenn die Lunge als Gewebe ein Ziel des AR darstellt (Abb. 5.3, Mikkonen et al. 2010), könnte mSoat hier möglicherweise androgenabhängig exprimiert werden.

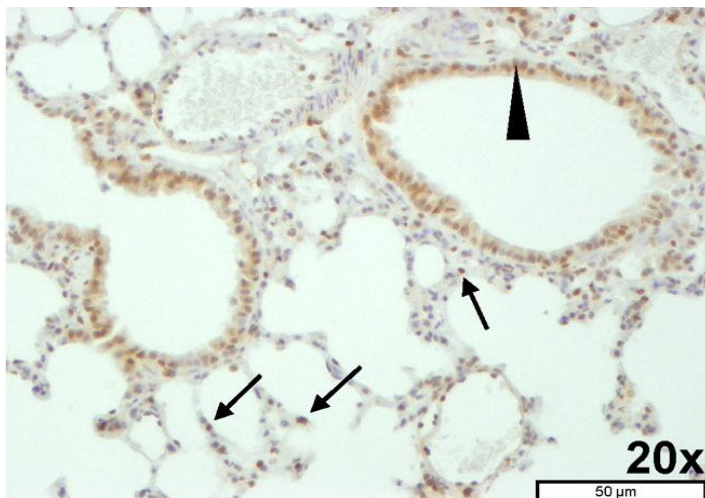


Abb. 5.3: Immunhistochemische Lokalisation des mAr in der Lunge einer männlichen FVB-Maus zeigt eine Anfärbung des Bronchialepithels und der Typ II Pneumozyten (aus Mikkonen et al. 2009)

5.1.4.2 Hoden

Eine immunhistologische Lagebestimmung des mSoat mit dem mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Antikörper im Hoden zeigte eine Färbung der pachytänen primären Spermatozyten, wobei vor allem ein Bereich mit ovaler Form in der Nähe des Nukleus eine starke Immunfärbung zeigte (Abb. 4.8), welcher eventuell das trans-Golgi Netzwerk darstellt, aus dem das Akrosom entsteht (Holstein et al. 1981). Die Expression des mSoat-Proteins könnte dort einen intermediären Zustand der Proteinsortierung darstellen, bevor in späteren Stadien der Spermatogenese die Translokation in die Zellmembran erfolgt.

In SCCx43 *Knockout*-Mäusen (SC = Sertoli cell, Cx43 = Connexin 43) konnte dieses positive Signal der pachytänen primären Spermatozyten nur in den Tubuli seminiferi mit vorhandenen frühen Keimzellen nachgewiesen werden, in den Tubuli ohne Keimzellen hingegen, in denen nur Sertoli-Zellen (SCO, sertoli cells only) vorkommen, nicht. Connexine stellen die kleinste Einheit von Gap Junction-Kanälen dar. Sie erlauben den Durchtritt verschiedener Signalmoleküle, wie z.B. von Ionen und Molekülen (1-1,5 kDa) und ermöglichen so eine direkte Kommunikation und Koordination verschiedener Zelltypen eines Gewebes und regulieren unter

anderem die Sertolizellreifung; Cx43 ist dabei das dominante Connexin im Hoden. Es wird von peritubulären Zellen, Leydigzellen, als auch Sertoli- und Keimzellen gebildet und seine Expression geht mit der Initiierung der Spermatogenese in der Pubertät einher (Sridharan et al. 2007; Giese et al. 2012). Auf Grund einer Herzmissbildung sterben generalisierte Cx43 *KnockOut* (KO)-Mäuse direkt nach der Geburt, weshalb ein konditioneller KO, der selektiv zu einer Cx43-Deletion in den Sertolizellen mit einhergehender Infertilität führt, für die immunhistochemische Untersuchung genutzt wurde.

Die physiologische Rolle von DHEAS, E₁S und PREGS im Hoden ist noch nicht bekannt, aber die Existenz von Steroidsulfatase in Keimzellen vor der Meiose, während (in pachytänen Spermatozyten) und nach der Meiose (Spermatiden) konnte in Keimzellen demonstriert werden (Raman und Das 1991). Außerdem zeigten mikrosomale Fraktionen von humanem Hodenhomogenat eine Steroidsulfataseaktivität (Payne 1972). Der Hoden des Menschen ist in der Lage große Mengen an sulfatierten Steroiden wie PREGS und DHEAS zu produzieren (Laatikainen et al. 1971; Ruokonen et al. 1972), aus denen Testosteron synthetisiert werden kann (Payne et al. 1971; Payne et al. 1973; Payne and Jaffe 1975). Zusätzlich zeigten Martel et al. 1994 in Rhesusaffen, dass sowohl Hoden als auch Lunge alle enzymatischen Aktivitäten aufweisen, um die biologisch aktiven Steroide Estradiol und Dihydrotestosteron aus DHEAS herzustellen. Primäres Ziel für Androgene im Hoden sind jedoch nicht die Keimzellen, sondern Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und peritubuläre Zellen, in denen die Expression des AR festgestellt wurde (Walker 2009). Eine weitere Veröffentlichung unterstützt das Auftreten steroidmetabolisierender Enzyme im Hoden. Hier wurde im Hoden von Mäusen eine hohe Umsetzung von E₁S zu 17 β -Estradiol festgestellt (Milewich et al. 1984). Im Jahr 1993 wurde von der Präsenz der Aromatase (CYP19A1) in Keimzellen adulter Mäuse berichtet, wobei eine Lokalisation im Golgi-Apparat der runden Spermatiden und im gesamten Zytoplasma der elongierten und späten Spermatiden festgestellt wurde (Nitta et al. 1993). Auch beim Menschen wurde die Expression der Aromatase in männlichen Keimzellen untersucht (Carreau et al. 2003; Lambard et al. 2003).

Durch die Lokalisation von mSoat in pachytänen Spermatozyten könnte mSoat bzw. SOAT eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Keimzellen während der Spermatogenese zukommen, z.B. durch vermehrte Aufnahme von sulfatierten Steroidhormonen ab der Pubertät.

5.1.4.3 Haut

In der Epidermis zeigte sich für den mSoat₃₂₉₋₃₄₄-Antikörper eine immunhistologisch starke Anfärbung der Epidermis; das Stratum corneum und die Dermis blieben ungefärbt. In der Haut spielt die Steroidsulfatase eine sehr wichtige Rolle. Ein Fehlen von StS ist assoziiert mit der X-chromosomal-rezessiven Ichthyose (Webster et al. 1978; Hernandez-Martin et al.

1999). Klinische Charakteristika sind ein Abschälen der Haut mit großen, dunkelbraunen Schuppen und einem Zuwachs der Dicke des Stratum corneum (Hoyer et al. 1986). Immunhistologische Anfärbungen zeigten eine vorherrschende StS-Expression in den dermalen Papillen von Haarfollikeln (Hoffmann 2001a,b). In der Haut werden alle steroidogenen Enzyme exprimiert, die für eine Umsetzung von DHEAS zu DHT, das Androgen, welches den AR in Haarfollikeln aktiviert, benötigt werden (Hay und Hodgins 1973). SOAT könnte als Transporter für sulfatierte Steroidhormone eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme dieser Androgene in die Haut darstellen.

5.1.4.4 Harnblase

In der Harnblase zeigten die oberflächlichen Deckzellen des Urothels ein starkes immunhistochemisches Signal, die intermediären und basalen Urothelzellen sowie der Musculus detrusor vesicae ein moderates, die Lamina propria dagegen keine Anfärbung (Abb. 4.8 F). Veröffentlichungen über sulfatierte Steroidhormone, Steroidsulfatase und Transportmechanismen mit Ausnahme von Endo- und Exozytose sind für die Harnblase rar. Die Expression der Effluxtransporter MDR1, MRP2 und MRP3 konnte in 63 Proben aus Blasenkrebsgewebe gezeigt werden (Tada et al. 2002). Transportwege für Natrium, Kalium, Chlorid, Harnstoff, Kreatinin und Wasser wurden im Uroepithel beschrieben (Khandelwal et al. 2009). Auch wenn in dieser Doktorarbeit eine geringe Expression des AR in der Harnblase gezeigt werden konnte und mSoat dadurch reguliert werden könnte, bleibt die physiologische Rolle von mSoat in der Harnblase unklar.

Zusammenfassend zeigt sich, dass bzgl. der Genexpression in endokrinen und nicht endokrinen Geweben als auch bei den Transportkinetiken Unterschiede zwischen mSoat und SOAT auftreten. Nichtsdestotrotz können beide Proteine als homologe Transporter angesehen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Resultate, die durch Versuche an einer mSoat-Knockout Maus erhalten werden, auch auf den Menschen übertragen werden können.

5.2 Der Soat des Schweins

5.2.1 Verwandtschaftsanalyse der SLC10A6-Familienmitglieder

Bei Betrachtung der Aminosäuresequenzidentitäten fällt auf, dass Maus und Ratte untereinander die höchste Sequenzidentität besitzen (90,8 %), sich aber deutlich von allen anderen Spezies durch die höchsten prozentualen Divergenzen abgrenzen (Tab. 5.2, Abb. 5.4). Der Mensch zeigt die höchste Homologie zu Hund und Pferd mit 86,2 %; aber auch das Schwein

beweist mit 82,2 % eine phylogenetisch enge Verwandtschaft. Zur Beurteilung der physiologischen Rolle des humanen SOAT könnte demnach auch das Schwein als Modelltier dienen.

Tab. 5.2: Prozentuale Aminosäuresequenzidentität und Divergenz verschiedener SLC10A6-Familienmitglieder, berechnet mit der Software MegAlign (DNASTar Version 8.0.2, Lasergene).

	Hund	Maus	Pferd	Ratte	Rind	Schwein	Mensch	Identität in %
Hund		69,2	86,5	69,7	77,5	81,4	86,2	
Maus	39,6		71,3	90,8	64,9	68,2	71,0	
Pferd	15,0	36,1		71,1	79,8	84,4	86,2	
Ratte	38,7	9,8	36,5		64,9	69,6	70,5	
Rind	26,9	47,1	23,5	47,2		77,9	77,7	
Schwein	21,4	41,2	17,5	38,9	26,3		82,2	
Mensch	15,3	36,6	15,3	37,4	26,5	20,3		
Divergenz in %								

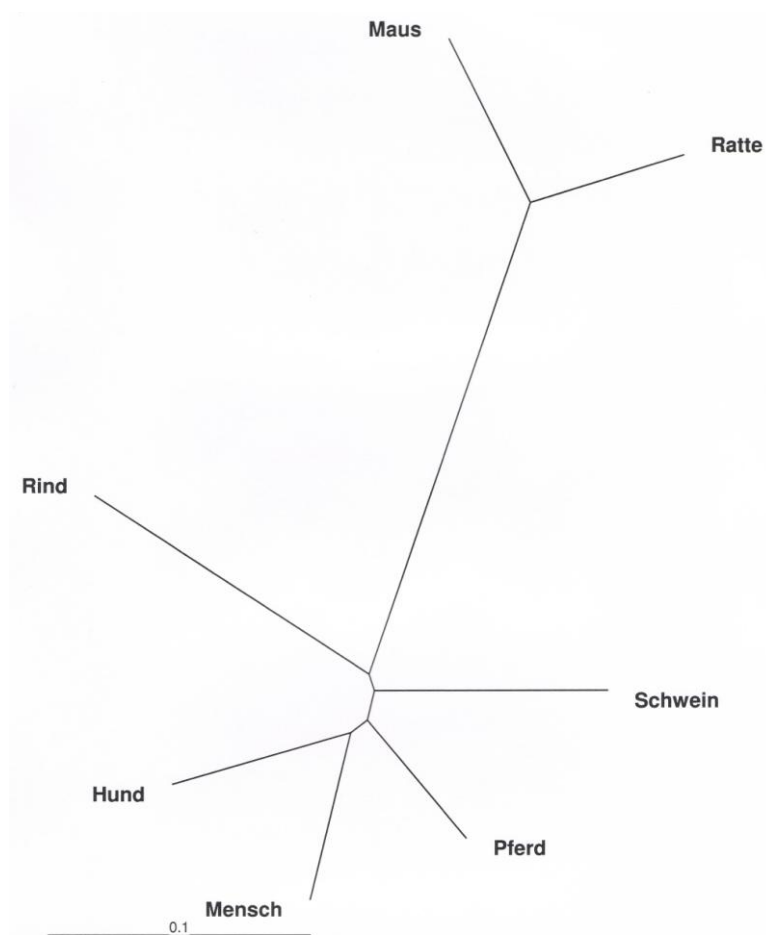


Abb. 5.4: Verwandtschaftsdiagramm der SLC10A6-Familienmitglieder. Die Darstellung mit Tree-View 1.6.6 beruht auf einem Alignment folgender SOAT/Soat-Sequenzen: Human: NP_932069, Hund: XP_851303, Pferd: NP_001157440, Rind: ABM68134, Schwein: durch die RACE-PCR erhaltene Sequenz nach Alignment mit der genomischen Sequenz NW_003610973, Maus: NP_083691.1, Ratte: NP_932166

5.2.2 Die physiologische Rolle des susSoat

Durch quantitative RealTime-PCR konnte eine 465-fache Erhöhung der susSoat-Expression im Hoden eines 250 Tage alten geschlechtsreifen Schweins gegenüber dem Hoden eines präpubertären 50 Tage alten Schweins festgestellt werden. SOAT scheint also im Hoden erst ab der Pubertät eine Rolle zu spielen, was in Verbindung mit der gezeigten Proteinexpression in pachytänen primären Spermatozyten bei der Maus in Bezug auf eine mögliche Rolle des Soat während der Spermatogenese durchaus einen Sinn ergeben würde. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass im Eberhoden PREGS und DHEAS zu Testosteron metabolisiert werden können (Ruokonen 1978). Aber auch große Mengen an freien und konjugierten Estrogenen, vor allem E₁S als nachgewiesenes Substrat des Soat/SOAT, konnten im Blut des Ebers bestimmt werden (Claus und Hoffmann 1980; Hoffmann et al. 2010). Im adulten Eber wurden in der testikulären Vene durchschnittlich 220 nmol/l E₁S, in der testikulären Arterie und Peripherie dagegen nur ca. 40-60 nmol/l E₁S gefunden; die Konzentrationen an sulfatierten Estrogenen in der testikulären Vene sind also ca. 100-fach erhöht verglichen mit den freien Estrogenen (Hoffmann et al. 2010). Beim Menschen findet die Spaltung von PREGS hauptsächlich in den Tubuli seminiferi und nicht im Interstitium statt, deshalb muss die StS Aktivität auf die Sertolizellen und/oder Keimzellen beschränkt sein (Kawano et al. 1973, Payne et al. 1973). Im Eberhoden konnte StS jedoch nur im Zytoplasma von Leydigzellen nachgewiesen werden (Mutembei et al. 2009). Da die Leydigzellen des Ebers Aromatase exprimieren (Fraczek et al. 2001; Mutembei et al. 2005), können freie unkonjugierte Estrogene produziert werden, die ihre Wirkung an ER α und ER β -Rezeptoren entfalten, denn sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression von ER α und ER β konnte in Spermatozyten, primären Spermatozyten (ER α) und Sertolizellen (ER β) des Ebers nachgewiesen werden (Lekhkota et al. 2006; Wagner et al. 2006). Mutembei et al. 2005 konnten dagegen auch in Keimzellen mit Ausnahme der elongierenden und elongierten Spermatischen eine immunhistochemische Anfärbung für ER β nachweisen. Eine *in silico* Promotorsequenzanalyse des susSoat zur Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen steht noch aus.

5.3 Substratvergleich von SOAT, NTCP und ASBT

Trotz der hohen phylogenetischen Verwandtschaft zeigen NTCP, ASBT und SOAT deutliche Unterschiede in der Substraterkennung. Auch wenn bereits bekannt ist, dass NTCP und ASBT vor allem Gallensäuren transportieren und eine wichtige Rolle im enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren spielen (Wong et al. 1995; Hagenbuch und Meier 1994; Craddock et al. 1998; Schröder et al. 1998; Kramer et al. 1999), gibt es bislang keine systematische

Untersuchung, welche die Transportfunktion dieser nahe verwandten Transporter direkt miteinander vergleicht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Substratvergleich an stabil transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt, welche jeweils NTCP, ASBT oder SOAT überexprimieren, um unterschiedliche Merkmale in der Substraterkennung anhand der funktionellen Gruppen dieser sehr ähnlichen Substanzen zu bestimmen.

5.3.1 Das Substratprofil von SOAT, NTCP und ASBT

Die Substratspezifität wurde anhand verschiedener Substratgruppen durch radioaktive Aufnahmemessungen verglichen, eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse folgt. Zum einen wurden die sulfatierten Steroidhormone DHEAS, E₁S und PREGS von NTCP und SOAT transportiert, vom ASBT jedoch nicht, während die nicht konjugierten Steroidhormone Cortison und Cortisol von keinem der Transporter aufgenommen wurden. Für den NTCP konnte erstmals eine niedrige Transportrate für Estron-3 β -D-glucuronid festgestellt werden, die sich durch TC hemmen ließ.

Unkonjugierte Gallensäuren wie z.B. Cholat, Chenodeoxycholat und Deoxycholat als auch Glycin-konjugierte Gallensäuren wie Glycocholat, Glycodeoxycholat und Glycochenodeoxycholat werden nur von NTCP und ASBT transportiert, wobei die Glycin-konjugierten mit über 1000 pmol/mg Protein gegenüber den korrespondierenden nicht konjugierten Gallensäuren mit teilweise unter 200 pmol/mg Protein in 30 min transportiert werden (Tab. 5.3). Nur Lithocholat wird als einzige aller Gallensäuren von keinem Transporter aufgenommen. Die Taurin-konjugierten Gallensäuren wie TC, Taurodeoxycholat und Taurochenodeoxycholat werden nur von NTCP und ASBT mit über 1000 pmol/mg Protein in 30 min in die Zelle transportiert, von SOAT dagegen nicht. Jedoch konnte erstmals ein Substrat für alle drei Transporter gefunden werden: TLC.

Für TLCS wurde zwar bereits ein Transport durch SOAT gezeigt (Döring, Dissertation 2010). Diese TLCS-Aufnahme konnte jedoch für den SOAT, im Gegensatz zum NTCP und in geringem Maß auch für den ASBT, nicht bestätigt werden. Grund hierfür scheint die Stabilität von TLCS in hydrophilen Lösungen zu sein. TLCS zerfällt im hydrophilen Transportpuffer zeitabhängig in mehrere Bestandteile (Abb. 4.32, 4.33). Ausgeschlossen werden konnte ein Zerfall zu TLC, Lithocholat und Taurin. Womöglich wird jedoch einer der entstehenden Komponenten durch SOAT transportiert. Während bei einer nur 15-minütigen Inkubation von TLCS im Transportpuffer keine Aufnahme nachweisbar war, konnte bei einer 2-stündigen Inkubation ein signifikanter Transport von dieser entstandenen Komponente durch SOAT festgestellt werden. Die Untersuchung mittels Dünnschichtchromatographie zeigte bei einer 15-minütigen Inkubation im Transportpuffer noch einen deutlichen TLCS-Peak, der jedoch bei einer 2-stündigen Inkubation kaum noch vorhanden war, dafür aber mindestens sechs weitere Peaks.

Außerdem wurde die Aufnahme von Taurin am SOAT untersucht, um eine mögliche Verunreinigung von TLC oder TLCS durch Taurin mit eventuellen Transporteigenschaften auszuschließen. Taurin wurde nicht vom SOAT transportiert, auch wenn eine geringe Natrium-abhängige Aufnahme festgestellt werden konnte, die aber auch in den Kontrollzellen auftrat. Ein Natrium- und Chlorid-abhängiger Taurintransporter (TAUT; Satsu et al. 2003; Han et al. 2006) ist bereits bekannt und könnte möglicherweise in HEK293-Zellen exprimiert werden. Tab. 5.3 zeigt die Leistung der Aufnahme von SOAT, NTCP und ASBT für alle getesteten Substanzen an.

Tab. 5.3: Substratprofil von SOAT, NTCP und ASBT. Für die sulfatierten Steroidhormone gilt: +: Aufnahme von <10 pmol/mg Protein in 10 min, ++: 10-100, +++: >100 pmol/mg Protein in 10 min: Für die Gallensäuren gilt: +: Aufnahme von <500 pmol/mg Protein in 30 min, ++: 500-1000, +++: >1000 pmol/mg Protein in 30 min.

	SOAT	NTCP	ASBT
DHEAS	++	+	—
E₁S	+	++	—
PREGS	+++	+++	—
Cortison	—	—	—
Cortisol	—	—	—
Estron-3βD-glucuronid	—	+	—
Estradiol-17βD-glucuronid	—	—	—
Cholat	—	++	+
Chenodeoxycholat	—	+	+
Deoxycholat	—	+	+
Ursodeoxycholat	—	+	+
Lithocholat	—	—	—
Sarkosincholat	—	+	+
Glychocholat	—	+++	++
Glycodeoxycholat	—	+++	++
Glycochenodeoxycholat	—	+++	++
Glycoursodeoxycholat	—	+++	++
Taurolithocholat-3-sulfat	—	+++	+
Taurocholat	—	+++	++
Taurodeoxycholat	—	+++	++
Taurochenodeoxycholat	—	+++	++
Tauroursodeoxycholat	—	+++	++
Taurolithocholat	++	+++	+++

Nach der Untersuchung des Natrium-abhängigen Transports zeigte ein Vergleich der transportkinetischen Bestimmungen, dass die sulfatierten Steroidhormone DHEAS und E₁S vom SOAT mit einer höheren Affinität als vom NTCP transportiert werden, während PREGS zu beiden Transportern eine ähnliche Affinität besitzt (Tab. 5.4). Die Kapazität von SOAT und NTCP für DHEAS ist nahezu identisch; NTCP zeigte dagegen eine höhere Kapazität für E₁S,

während SOAT eine höhere Transportrate für PREGS erkennen ließ. Das Substrat aller drei Transporter, das TLC, wird mit einer ähnlich moderaten Affinität vom SOAT und NTCP in die stabil transfizierten Zellen aufgenommen, die höchste Affinität mit einem K_m -Wert von 5,9 μM wies es zum ASBT auf. Der NTCP kann für die TLC-Aufnahme als *high capacity* Transporter angesehen, SOAT dagegen als *low capacity* Transporter. TC wird ähnlich affin vom NTCP und ASBT transportiert.

Tab. 5.4: Vergleichende transportkinetische Parameter von SOAT, NTCP und ASBT für DHEAS, E₁S, PREGS, TLC und TC wurden in stabil transfizierten mSoat-HEK293-Zellen bestimmt. Kinetische Parameter von K_m (in μM) und V_{\max} -Werten (in pmol/mg Protein/min) wurden nach Michaelis-Menten mittels nicht-linearer Regression ermittelt. Berechnung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 4*. (* Die Werte wurden aus Geyer et al. 2007 entnommen).

		SOAT	NTCP	ASBT
DHEAS	K_m	28,7* \pm 3,9	56,1 \pm 8,0	—
	V_{\max}	1899* \pm 81	2198 \pm 102	—
E ₁ S	K_m	12,0* \pm 2,3	57,6 \pm 11,3	—
	V_{\max}	585* \pm 34	2367 \pm 171	—
PREGS	K_m	11,3* \pm 3,0	8,8 \pm 2,1	—
	V_{\max}	2168* \pm 134	1036 \pm 69	—
TLC	K_m	19,3 \pm 6,8	18,4 \pm 2,3	5,9 \pm 1,8
	V_{\max}	617 \pm 57,0	5915 \pm 189,5	1585 \pm 99,7
TC	K_m	—	13,1 \pm 0,8	14,7 \pm 1,5
	V_{\max}	—	2395 \pm 59,0	1821 \pm 75,1

5.3.2 Funktionelle Gruppen der Substraterkennung

Durch den Substratvergleich können unterschiedliche funktionelle Gruppen bestimmt werden, die für eine Aufnahme des jeweiligen Transporters notwendig sind; dabei muss wegen der unterschiedlichen cis-trans-trans- bzw. trans-trans-trans-Konformation zwischen den Anforderungen der funktionellen Gruppen an Gallensäuren und Steroidhormonen unterschieden werden. Da TLC als einzige Gallensäure vom SOAT transportiert wird, lassen sich nachstehende Schlussfolgerungen ziehen (s. Abb. 5.5):

- 1) Da TLCS nicht transportiert wird, darf also an Position 3 kein Sulfat die Hydroxygruppe ersetzen, zumindest solange eine zusätzliche Taurinkonjugation besteht.
- 2) An Position 6, 7 und 12 dürfen nur Wasserstoffatome angefügt sein; eine bestehende Hydroxygruppe verhindert bereits den Transport.
- 3) An Position 25 muss eine Taurinkonjugation bestehen, die nicht durch eine Glycin- oder Hydroxygruppe ersetzt werden darf.

Steroidhormone werden vom SOAT transportiert, solange eine Sulfatierung an Position 3 besteht. Ein Austausch durch eine Hydroxygruppe (z.B. Estron, Estradiol und DHEA, s. Geyer et al. 2007) oder eine Glucuronidkonjugation unterbinden einen Transport.

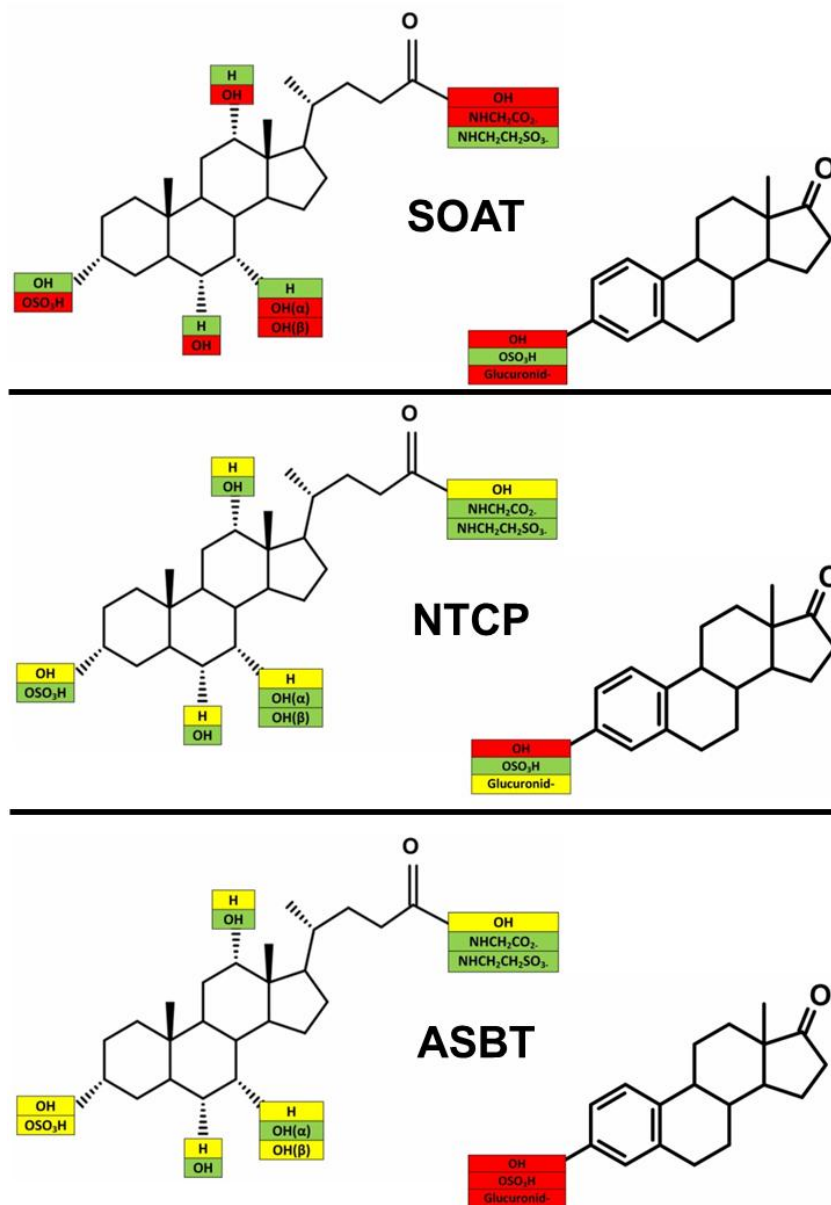


Abb. 5.5.: Strukturanforderungen der funktionellen Gruppen von Gallensäuren (links) und Steroidhormonen (rechts, mit Estron als Beispiel), die zur Substraterkennung des SOAT, NTCP und ASBT notwendig sind. Grün unterlegt sind die chemischen Gruppen, die einen Transport ermöglichen, rot diejenigen, die einen Transport verhindern. Gelb sind funktionelle Gruppen hinterlegt, die eine Aufnahme beeinträchtigen können, bzw. eine niedrige Aufnahme zeigen. Bei einer Substanz wie z.B. Lithocholat, bei der alle gelb hinterlegten Felder zutreffen, kann ein Transport unterbunden werden.

Der NTCP transportiert im Gegensatz zum SOAT alle Gallensäuren außer Lithocholat. Wenn demnach alle fünf in Abb. 5.5 gelb markierten funktionellen Gruppen an einer Gallensäurestruktur gleichzeitig vorhanden sind, wird ein Transport durch NTCP verwehrt. Bei den nicht konjugierten Gallensäuren zeigt sich eine wesentlich höhere Aufnahme bei Cholat und Deoxycholat gegenüber Chenodeoxycholat und Ursodeoxycholat (Abb. 4.21), die durch eine zusätzliche OH-Gruppe an Position 12 entsteht. Außerdem nimmt der NTCP sulfatierte Steroidhormone und in einem geringen Maße auch Estron-3 β -D-glucuronid, aber keine unsulfatierten Steroidhormone auf.

Der ASBT zeigt, gleich dem NTCP, eine Aufnahme aller Gallensäuren bis auf Lithocholat. Der Transport von Ursodeoxycholat und TLCS durch ASBT ist jedoch extrem gering verglichen mit ihren korrespondierenden konjugierten bzw. nicht konjugierten Gallensäuren.

Dadurch kann demonstriert werden, dass eine Sulfatgruppe an Position 3 und eine OH(β)-Gruppe an Position 7 den Transport wesentlich einschränken. Weder konjugierte noch unkonjugierte Steroidhormone sind Substrate des ASBT.

Bei Betrachtung der einzelnen Substratgruppen in ihrer räumlichen Struktur zeigen sich einige Unterschiede. Während die Steroidsulfate durch ihre trans-trans-trans-Verknüpfung der Ringe schmal erscheinen, zeigen die Gallensäuren durch die cis-trans-trans-Verknüpfung ein Abknicken des 1. Ringes und der Seitenkette, die mit einer wesentlich größeren Raumanforderung einhergeht. Dass sowohl DHEAS als auch TLC von SOAT als Substrat erkannt werden, könnte daran liegen, dass sich beim Übereinanderlegen der beiden Substrate die räumlichen Strukturen der Sulfat- bzw. Sulfongruppe gut (Abb. 5.6,C) überlagern. Dabei zeigt die Überlagerung außerdem, dass das Abknicken des A-Rings nicht von entscheidender Bedeutung ist; das Einführen einer OH-Gruppe an Position 7 oder 12, wie bei Taurodeoxycholat oder Taurochenodeoxycholat, würde dagegen den Raum erweitern und eine passgenaue Substraterkennung am SOAT-Protein verhindern.

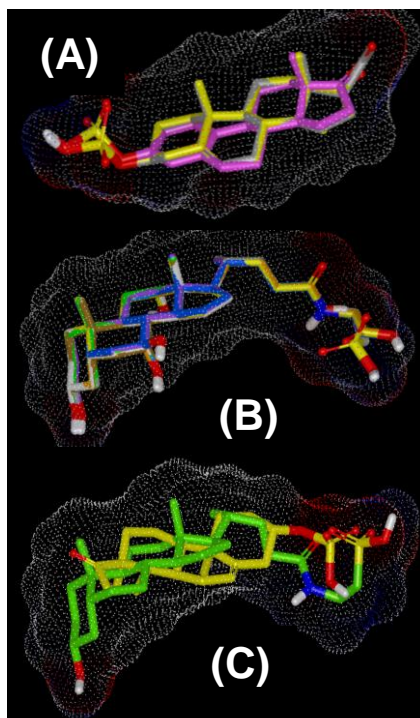


Abb. 5.6: Räumliche Anforderung von Steroidsulfaten (A), Gallensäuren (B) und die Überlagerung der SOAT-Substrate DHEAS (gelb) und TLC (grün). In der räumlichen äußeren Struktur sind negativ geladene Bereiche rot und positiv geladene blau gekennzeichnet. Sauerstoff wird rot, Schwefel gelb, Kohlenstoff grau und Stickstoff blau angezeigt (außer bei Überlagerungen). Diese Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Baringhaus (Sanofi, Frankfurt am Main) generiert.

Zusammenfassend zeigt sich, dass SOAT bei Steroidhormonen eine Sulfatgruppe an Position 3 benötigt, die bei der Gallensäure TLC durch die Sulfongruppe des Taurins ersetzt werden kann. Die Frage, welche Domänen bzw. Aminosäuren der Transportproteine über diese Unterschiede im Transportverhalten bestimmen, wird derzeit in einer weiteren Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit Mutations- und Chimärenstudien untersucht. Möglich ist, dass NTCP, da er die Substratspektren sowohl von ASBT (Gallensäuren) als auch SOAT (sulfatierte Steroidhormone) abdeckt, zwei Substratbindungsstellen aufweist.

Unterstützt wird diese These davon, dass ein Polymorphismus (C800T) mit resultierendem Aminosäureaustausch (S267F) beim NTCP zu einem Ausbleiben der Taurocholat- und Cholat-Aufnahme führt, E₁S aber weiterhin transportiert wird (Ho et al. 2004). Vorstellbar wäre aber auch, dass nur eine Substratbindungsstelle des NTCP aus zusätzlichen Bereichen besteht, die beim ASBT und SOAT nicht existieren, die aber eine Substraterkennung sowohl von sulfatierten Steroiden als auch Gallensäuren zulässt und die restriktiven Eigenschaften von ASBT und SOAT verbindet.

5.4 Vergleich der Pharmakophormodelle und des inhibitorischen Profils von SOAT, ASBT und NTCP

5.4.1 Die Bedeutung eines Pharmakophormodells

In seinem Beitrag „Über den jetzigen Stand der Chemotherapie“ beschrieb Paul Ehrlich im Jahr 1909 die Merkmale einer Pharmakophore, die für eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung verantwortlich sind. Der Begriff wurde 1971 erstmalig von Lemont B. Kier verwendet und geprägt. Laut IUPAC-Definition besteht ein Pharmakophor aus denjenigen Eigenschaften eines Moleküls, die für dessen pharmakologische Wirkung, stimulierend oder inhibierend, verantwortlich sind. Alle die sterischen und elektronischen Eigenschaften werden dabei berücksichtigt, die notwendig sind, um Wechselwirkungen mit einer bestimmten Zielstruktur (Target) zu ermöglichen und eine biologische Antwort auszulösen oder zu blockieren. Ein Pharmakophor repräsentiert dabei kein reales Molekül, sondern einen rein abstrakten Entwurf gemeinsam interagierender Moleküleigenschaften einer Gruppe von Substanzen zu deren Zielstruktur. Das Pharmakophor ist demnach bei verschiedenen getesteten aktiven Molekülen der größte gemeinsame Nenner von Moleküleigenschaften, die eine Wirkung am Target erzielen. Es wird nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip je nach Kenntnisstand der Proteinstruktur und Versuchsaufbau zwischen ligandbasiertem und proteinbasiertem Pharmakophor unterschieden.

Im Folgenden wird darauf eingegangen, warum die Erstellung eines Pharmakophormodells von Bedeutung ist. In der Arzneimittelentwicklung steht zuerst die Frage im Raum, für welche Krankheit eine unzureichende Behandlungsmethode existiert und welche Zielstrukturen, meist Proteine, mit dieser Krankheit in Verbindung stehen. Darauf folgt ein sog. *Screening*, bei dem eine Vielzahl von Substanzen auf eine mögliche Wirkung an dem Target getestet werden. Durch die 3D-QSAR wird auf diese Weise ein Pharmakophormodell entwickelt; die 3D-QSAR erfasst dabei computergestützt quantitative Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung. Die Substanzen müssen deshalb unbedingt am gleichen Target mit dem gleichen Wirkmechanismus ansetzen und sollten bei den Bindungsaffinitäten einen Unterschied von insgesamt vier Zehnerpotenzen aufweisen. Wichtig ist,

dass die untersuchten Substanzen aus mehreren chemisch einheitlichen Serien stammen, so dass der Computer bei kleinen chemischen Veränderungen unterschiedliche Wirkungen erkennen und die Wirkstoffmoleküle strukturell überlagern kann. Durch ein virtuelles Screening, z.B. mit dem Programm Catalyst der Firma Accelrys, können aussichtsreiche Kandidaten, deren Konformation mit dem vorgegebenen Pharmakophormodell übereinstimmen, aus einer Datenbank herausgefiltert werden; deren Wirkung muss anschließend *in vitro* validiert werden. Durch das Pharmakophormodell kann also auf der Suche nach einem neuen Arzneistoff eine sog. Leitstruktur entdeckt werden. Diese Leitstruktur, die bereits eine erwünschte biologische Wirkung zeigt, dient dazu, durch gezielte chemische Variationen Analoga herzustellen, die die Leitstruktur bezüglich ihrer Wirkstärke oder Selektivität übertreffen (Klebe 2009; Böhm und Schneider 2000; Kubinyi 2001; Alvarez und Shoichet 2005).

5.4.2 Die Rolle und Erstellung des SOAT- Pharmakophormodells

SOAT wurde in hormonsensitiven Organen wie Hoden, Plazenta und Brustdrüse nachgewiesen und transportiert sulfatierte Steroidhormone, welche als Reservoir für die Synthese freier Steroidhormone mit deren potenten regulatorischen Funktionen an nukleären ER und AR angesehen werden (Geisler 2003; Reed et al. 2005; Selcer et al. 2002; Pasqualini und Chetrite 2005). In einer mit SOAT transfizierten hormonsensitiven Brustkrebszelllinie (T47D) konnte eine 10-fach höhere Sensitivität für E_1S im Proliferationsassay gegenüber den mit Leervektor transfizierten T47D-Kontrollzellen gezeigt werden; dieser Effekt war durch den selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen, dem Steroidsulfatase-Inhibitor STX64 und den SOAT-Inhibitoren 2- und 4-SMP hemmbar (Karakus, Dissertation 2009). Da zusätzlich die Expression von SOAT in Mammakarzinomen nachgewiesen werden konnte (Funk, Dissertation 2009), könnte SOAT durch die Aufnahme sulfatierter Steroidhormone zur intrakrinen Synthese von Estrogenen im Brustkrebsgewebe beitragen. Durch das SOAT-Pharmakophor ist es jetzt möglich potente Inhibitoren des SOAT zu entwickeln. Ein SOAT-Inhibitor könnte eine Alternative in der Behandlung von hormonabhängigen Krebsarten durch Aromatasehemmer oder ER-Antagonisten darstellen, da durch die Inhibition des SOAT bereits die Aufnahme der hormonellen Vorstufen in die Zelle verhindert wird.

Zur Erstellung des SOAT-Pharmakophors wurden zahlreiche Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung des SOAT untersucht, darunter 19 Gallensäuren. Abb. 5.7 zeigt zusammengefasst die Wirkungen der verschiedenen funktionellen Gruppen auf die Inhibition des SOAT-Transports von DHEAS. An Position 3 der Gallensäurestruktur mit *cis-trans-trans*-Konformation führt eine Sulfatgruppe zu einer stärkeren Inhibition gegenüber einer Hydroxygruppe. Sowohl an Position 6 als auch an Position 12 beeinträchtigt eine Wasserstoff ersetzende Hydroxygruppe die inhibitorischen Fähigkeiten deutlich. An Position 7 zeigt sich folgendes inhibitorisches Muster: Wasserstoff und OH(α) hemmen gut; eine Ketongruppe

zeigt eine verminderte, aber moderate Hemmung, eine OH(β)-Gruppe dagegen eine deutliche Verschlechterung der inhibitorischen Leistung.

Außerdem wurde das Scymnolsulfat, die in der Galle des Haifisches hauptsächlich vorkommende Gallensäure, getestet; die Struktur der Gallensäure, bei der antioxidative und hepatoprotektive Eigenschaften festgestellt wurden, ist in Abb. 4.37 dargestellt und zeichnet sich durch eine Sulfatgruppe aus (Harney et al. 2008; Fricker et al. 1997). Mit einem IC_{50} -Wert von 23,3 μ M zeigt Scymnolsulfat eine gute Inhibition des SOAT.

Die dimerisierten, durch einen „Abstandhalter“ gekoppelten Gallensäureanaloga S 1690, S 0960 und S 3068 (Abb. 4.44 und Tab. 4.14) konnten als hochpotente SOAT-Inhibitoren identifiziert werden.

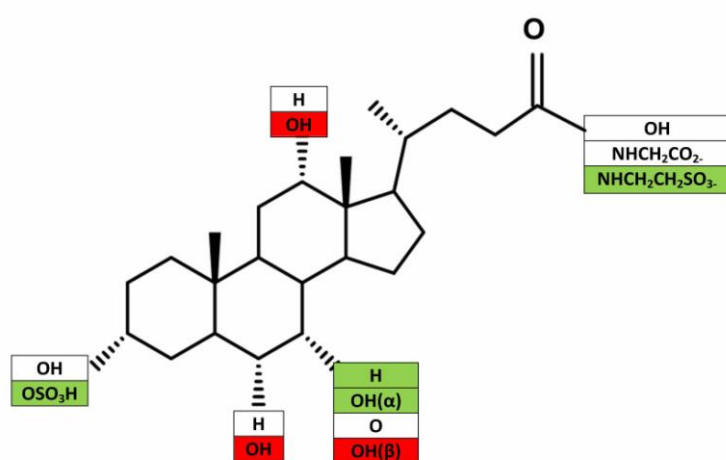


Abb. 5.7: Inhibitorische Veränderungen der SOAT-spezifischen DHEAS-Aufnahme durch Substitution verschiedener funktioneller Gruppen bzw. Atome an einer Gallensäurestruktur. Grün sind die funktionellen Gruppen/Atome unterlegt, die zu einer deutlichen Verstärkung der inhibitorischen Aktivität führen; rot unterlegt die Gruppen/Atome, die zu einer deutlichen Verschlechterung führen, während weiß unterlegte Gruppen/Atome einen Vergleich zu den anderen angegebenen Gruppen/Atomen an gleicher Stelle angeben und zu einer moderaten Hemmung führen.

Während die Gallensäuren zum großen Teil den SOAT inhibieren, zeigten die meisten Steroide kein hemmendes Potenzial. Nur die Substrate E_1S und PREGS, außerdem Cortison und das Steroidglycosid Digitonin mit cis-trans-cis-Anordnung erwiesen einen IC_{50} -Wert von unter 30 μ M.

Als Leitstruktur für die Weiterentwicklung eines potenten SOAT-Inhibitors könnten die zwei getesteten inhibierenden Betulinderivate EMe I 4 und SAL-II-101 eine Rolle spielen. Betulinsäuren und deren Derivate sind in einigen Pflanzen wie z.B. der Birkenrinde mit einem Anteil des Trockengewichts von bis zu 30 % natürlich vorkommende Triterpene, die durch spezifische Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorzelllinien eine Zytotoxizität hervorrufen, aber bei Mäusen bis zu 500 mg/kg Körpergewicht keine toxischen Anzeichen verursachen (Sami et al. 2006; Mullauer et al. 2009; Mullauer et al. 2010). So könnten Betulinderivate idealerweise zwei Effekte miteinander verbinden: die SOAT-spezifische Aufnahme sulfatierter Steroidhormone mit einhergehender Proliferation zu unterbinden, und die geschädigte Zelle durch Apoptoseinduktion unschädlich zu machen.

Das *training set*, also die für das SOAT-Pharmakophormodell ausgewählten Substanzen der getesteten Inhibitoren, umfasste fünf Zehnerpotenzen an IC_{50} -Werten und lieferte *in silico* als beste Hypothese ein aus drei hydrophoben Bereichen und zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren bestehendes SOAT-Pharmakophormodell. Dieses Modell mit fünf Charakteristika konnte auf Grundlage einer Überschneidung von TLCS zusammen mit S 1647 *in vitro* validiert werden. Nachfolgend wird dieses Modell mit den bereits erstellten cAsbt, ASBT und NTCP-Pharmakophoren verglichen.

5.4.3 Vergleich der Pharmakophoren von SOAT und cAsbt/ASBT

Wie bereits erwähnt zeigen ASBT und SOAT eine hohe Aminosäuresequenzidentität von 41,8 %, so dass Parallelen im inhibitorischen Profil abzuklären sind. Durch das im Rahmen dieser Doktorarbeit erstellte Pharmakophormodell ist es möglich, einen Vergleich zu bereits erstellten Pharmakophoren von cAsbt (Asbt des Kaninchens) und humanem ASBT anzustellen. ASBT steht im Fokus des pharmakologischen Interesses. Im Hinblick auf das Wirkstoffdesign könnte die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln durch Kopplung an ASBT-Substrate verbessert werden (Balakrishnan und Polli, 2006). Außerdem könnte eine Inhibition des ASBT mit einhergehender Cholesterinsenkung zur Prävention von Arteriosklerose führen, da die Inhibition der Wiederaufnahme von Gallensäuren durch sog. *BARIs* (*bile acid reabsorption inhibitors*) die Synthese von neu gebildeten Gallensäuren aus Cholesterin anregt (Kramer und Glomik, 2006).

Für SOAT besteht die beste Hypothese einer berechneten SOAT-Pharmakophore aus drei hydrophoben Bereichen und zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren (Abb. 4.38). Dagegen ist das Pharmakophormodell des cAsbt durch einen Wasserstoffbrückendonator, einen Wasserstoffbrückenakzeptor und drei hydrophobe Gruppen charakterisiert (Abb. 5.8; Baringhaus et al. 1999). Von 14 Substanzen, die als *training set* zur Erstellung der cAsbt-Pharmakophore dienten, wurden auch für den SOAT IC_{50} -Werte bestimmt (Tab. 4.14). Ein Vergleich beider Ergebnisse zeigt eine Korrelation mit einem Koeffizienten von $r = 0.54$ mit $p < 0,05$. Da ein Wert von 0 keine Korrelation und ein Wert von 1 eine 100 %-ige Übereinstimmung darstellt, weist der berechnete Koeffizient von $r = 0,54$ auf eine teilweise Konformität der fünf aufgezeigten charakteristischen Bereiche beider Transporter hin. Ähnliche IC_{50} -Werte konnten für die Propanolamine S 8005, S 8214, S 9202, das Benzothiazepin S 0381, das Barbiturat S 3740 und die Substanz S 1647 gemessen werden, während sich die IC_{50} -Werte für S 9087, S 9203, S 0382, S 0925, S 1690, S 0960 und S 9086 zwischen cAsbt und SOAT deutlich voneinander unterschieden.

Tatsächlich können, dadurch dass Baringhaus et al. die Gallensäure TC in das Pharmakophormodell des cAsbt eingefügt haben (Abb. 5.9), Gemeinsamkeiten mit dem SOAT-Modell mit eingefügtem TLCS festgestellt werden. In Abb. 5.9 sind zwei Möglichkeiten vom Einsetzen des TC in das cAsbt-Pharmakophormodell dargestellt, zum einen mit Verwendung der 12-OH-Gruppe, zum anderen mit der 7-OH-Gruppe als Wasserstoffbrückendonator. Dabei erfüllen beide Möglichkeiten vier von fünf Charakteristika des Modells und die Sulfonylgruppe an der Seitenkette des Taurins wird bei beiden als Wasserstoffbrückenakzeptor verwendet. Sowohl das SOAT-Pharmakophormodell, bei dem TLCS alle fünf Kennzeichen erfüllt, als auch das cAsbt-Modell mit der 12-OH-Gruppe als Wasserstoffbrückendonator präsentieren eine hydrophobe Region an der Methylgruppe an Position 21 in der Nähe einer weiteren hydrophoben Gruppe an Position 18 bei SOAT und am D-Ring für cAsbt. Außerdem zeigen beide Pharmakophormodelle eine Übereinstimmung der negativ geladenen Sulfonylgruppe der Taurin-konjugierten Seitenkette als Wasserstoffbrückenakzeptor an. Größter Unterschied zwischen beiden Modellen ist ein zusätzlicher Wasserstoffbrückendonator von cAsbt an Position 7, oder alternativ an Position 12, welcher beim SOAT-Modell fehlt, der dafür aber einen zusätzlichen Wasserstoffbrückenakzeptor am negativ geladenen Sulfat an Position 3 besitzt. Da die 14 Substanzen des *training set* auch auf eine mögliche Hemmung des Transports von PREGS durch mSoat getestet wurden und sich das inhibitorische Profil zwischen mSoat und SOAT weitgehend entspricht, kann mit großer Wahrscheinlichkeit ein ähnliches Pharmakophormodell zwischen mSoat und SOAT postuliert werden.

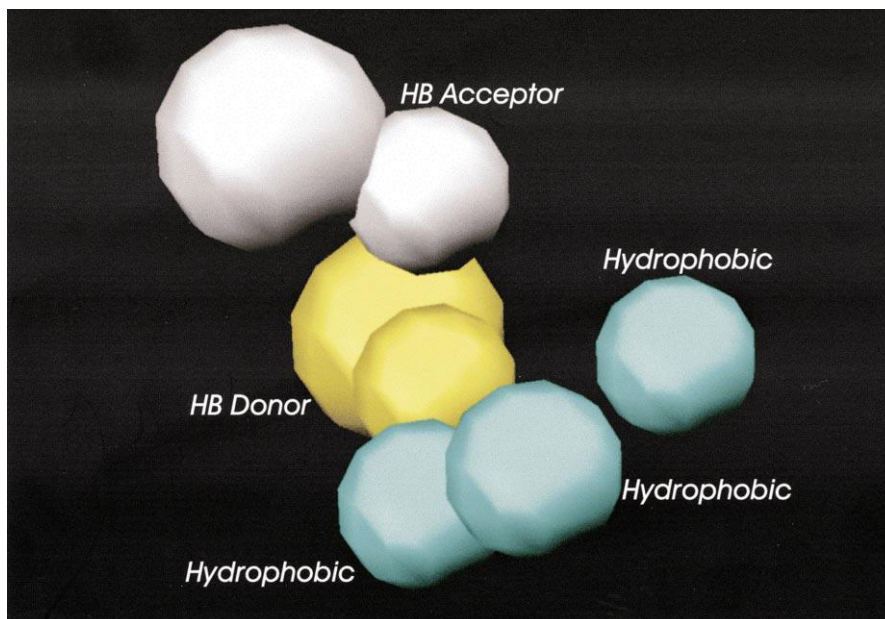


Abb. 5.8: Pharmacophormodell vom Asbt des Kaninchens (cAsbt) bestehend aus drei hydrophoben Gruppen (türkis), einem Wasserstoffbrückenakzeptor (weiß) und einem Wasserstoffbrückendonator (gelb) (aus Baringhaus et al. 1999).

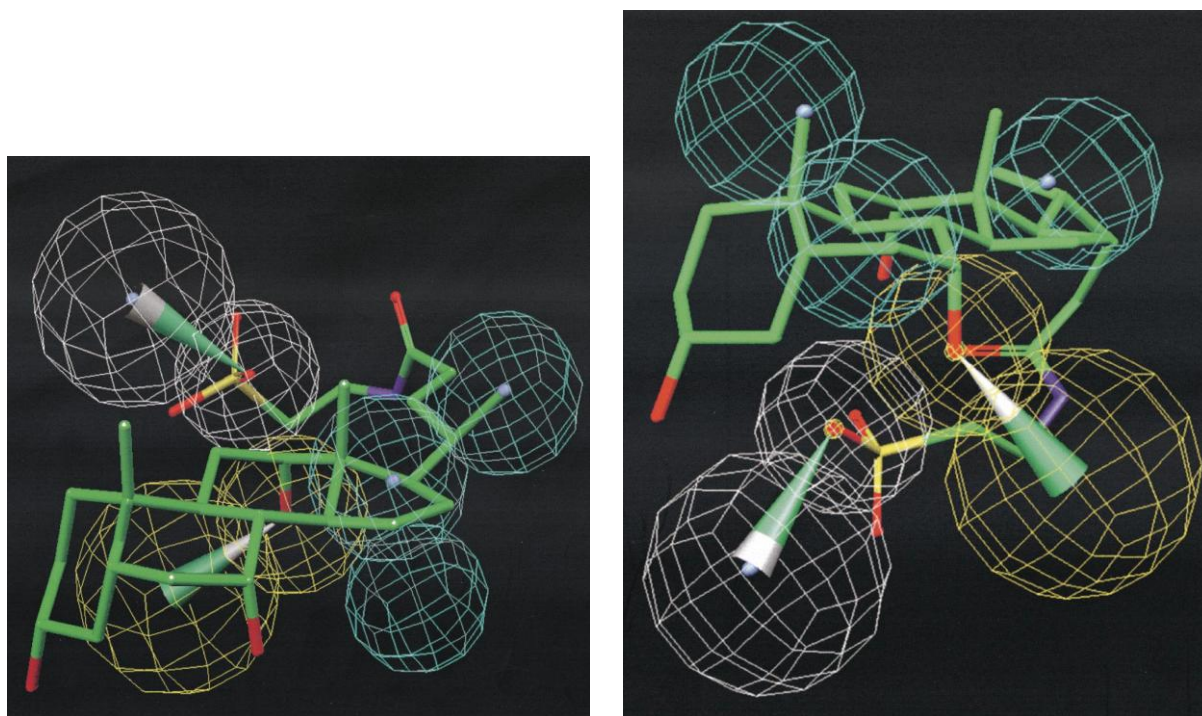


Abb. 5.9: Taurocholat eingefügt in das Pharmacophormodell des cAsbt mit Verwendung der 12-OH- (links) oder 7-OH- Gruppe (rechts) als Wasserstoffbrückendonator. Die drei hydrophoben Gruppen sind hellblau, der Wasserstoffbrückenakzeptor weiß und der Wasserstoffbrückendonator in gelber Farbe angezeigt (aus Baringhaus et al. 1999).

Für den humanen ASBT, der eine Aminosäuresequenzidentität von 86,7 % zum Asbt des Kaninchens besitzt, wurde bereits eine elektronegative Region an der Seitenkette von Gallensäuren für eine Substraterkennung durch *comparative molecular field analysis* (CoMFA) identifiziert (Swaan et al. 1997b). Die Autoren testeten die Gallensäuren Chenodeoxycholat, Deoxycholat und Lithocholat auf Inhibition des Transports von TC durch ASBT. Während sich Deoxycholat und Chenodeoxycholat als gute Inhibitoren erwiesen, hemmte Lithocholat nicht. Dagegen zeigte sich beim Transport von DHEAS durch SOAT nur eine schwache Inhibition durch Deoxycholat, wohingegen Lithocholat gute inhibitorische Eigenschaften aufwies. Nur Chenodeoxycholat zeigte bei beiden Transportern eine Inhibition des Transports. In einer anderen Studie wurden Inhibitionen (K_i -Werte) an der Aufnahme von TC durch ASBT-MSCK und ASBT-COS-Zellen vergleichend durchgeführt (Balakrishnan et al. 2005). Glycochenodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat, Glycodeoxycholat und Taurodeoxycholat stellten sich als gute Inhibitoren heraus, Ursodeoxycholat und Cholat zeigten dagegen eine unzureichende Inhibition. Im Großen und Ganzen stimmt dieses inhibitorische Profil der Gallensäuren mit den gemessenen SOAT-Inhibitionen überein (Tab. 4.9). Im Jahr 2009 wurde ein 3D-QSAR Modell für den humanen ASBT erstellt (Zheng et al. 2009). Dieses besteht aus drei hydrophoben Regionen, einem Wasserstoffbrückenakzeptor und fünf auszuschließenden nicht inhibierenden Regionen (Abb. 5.10) und ist somit bis auf einen fehlenden Wasserstoffbrückendonator deckungsgleich mit der cAsbt-Pharmakophore. Das *training set*, welches für die Erstellung der cAsbt-Pharmakophore verwendet wurde, wurde als zusätzliche Validierung der ASBT-Pharmakophore herangezogen, aber *in silico* berechnete Werte stimmten mit den gemessenen IC_{50} -Werten nicht überein. Als Erklärung geben die Autoren eine unterschiedliche Generierung der Pharmakophormodelle an. Einerseits wurden IC_{50} -Werte am Asbt des Kaninchens in CHO-Zellen bestimmt, andererseits K_i -Werte mit dem humanen ASBT in MDCK-Zellen. Trotz der hohen Aminosäuresequenzidentität ist ein unterschiedliches Pharmakophormodell zwischen cAsbt und ASBT nicht auszuschließen.

Bei der Validierung des SOAT-Pharmakophormodells zeigten vier Substanzen eine nennenswerte Inhibition des SOAT. Für diese Substanzen (T 5239532, T 5573915, T 5854015, T 0511-1698) wurden zusätzlich die IC_{50} -Werte am humanen ASBT bestimmt (Tab. 4.13); es waren jedoch keine Ähnlichkeiten festzustellen.

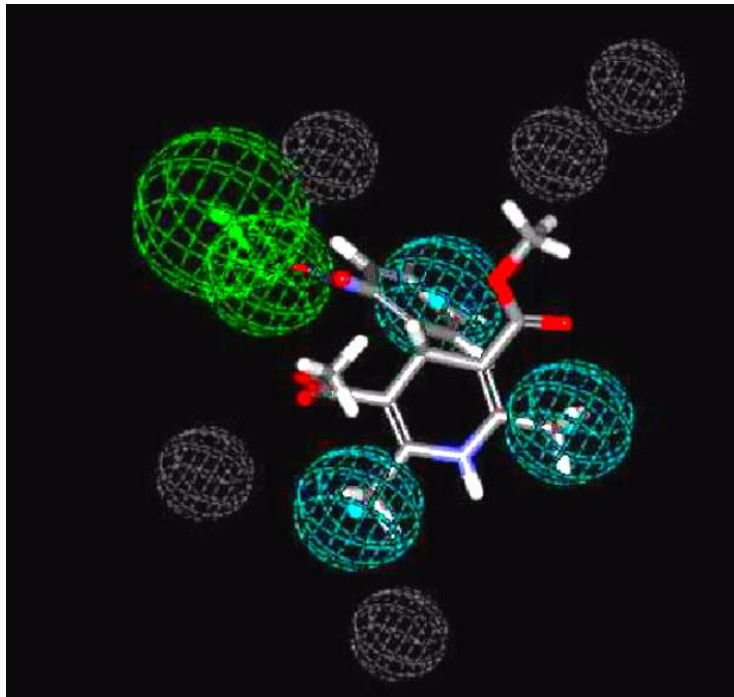


Abb. 5.10: Pharmakophore des humanen ASBT, aus 38 getesteten Molekülen abgeleitet, bestehend aus einem Wasserstoffbrückenakzeptor (grün), drei hydrophoben Regionen (hellblau), und fünf auszuschließenden nicht inhibierenden Regionen (grau). Die Abbildung zeigt den Kalziumantagonisten Nifedipin in das Pharmakophormodell eingefügt (Zheng et al. 2009).

5.4.4 Vergleich der Pharmakophoren von SOAT und NTCP bzw. NTCP und ASBT

Ein Pharmakophormodell für den NTCP, der immerhin eine Aminosäuresequenzidentität von 33,4 % zu SOAT und 34,9 % zu ASBT besitzt, wurde im Jahr 2012 von Greupink et al. veröffentlicht. Dabei wurde an stabil transfizierten NTCP-CHO-Zellen die Aufnahme von [^3H]TC mit verschiedenen Gallensäuren und E₁S gehemmt. Interessanterweise zeigte die beste Hypothese für ein NTCP-Pharmakophormodell exakt wie beim SOAT-Modell zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren und drei hydrophobe Regionen an. Die Integration von TC zeigt, dass die Sulfonylgruppe des Taurins, wie bei SOAT und ASBT, als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert. Der zweite Wasserstoffbrückenakzeptor befindet sich jedoch, im Gegensatz zu SOAT, an der Hydroxylgruppe an Position 7. Die hydrophoben Regionen an der Methylgruppe 21 und an Position 18 bzw. am D-Ring sind bei allen drei Transportern NTCP, cAsbt und SOAT identisch gelagert. Die dritte hydrophobe Gruppe bei Position 19 von NTCP, die beim cASBT- Pharmakophormodell keine Übereinstimmung bei Überlagerung mit TC aufweist, zeigt eine leicht veränderte Lage verglichen mit der Position am A-Ring von SOAT.

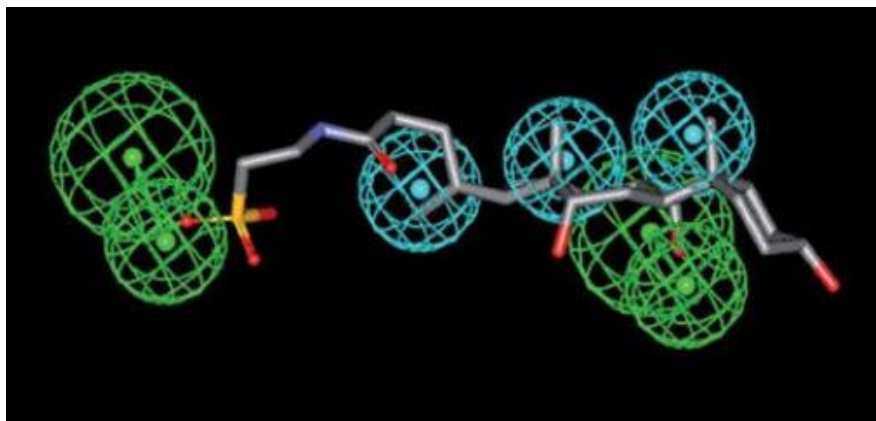


Abb. 5.11: Pharmakophormodell des NTCP mit zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren (grün; kleinere Sphäre zeigt den Ursprung der Wasserstoffbrücken, die größere den Vektor an) und drei hydrophoben Regionen (hellblau). TC füllt das Modell aus (Greupink et al. 2012).

5.4.5 Stimulierende Effekte

5.4.5.1 Charakterisierung der Stimulation des SOAT

Insgesamt 18 Substanzen führten zu einer erhöhten Akkumulation von DHEAS in den SOAT-HEK293-Zellen. Acht dieser Substanzen ließen sich in eine Gruppe zusammenfassen (Abb. 4.46), die bei steigender Konzentration eine erhöhte Aufnahme von DHEAS bewirkte und auch bei den höchsten getesteten Konzentrationen keine Inhibition bzw. Wiederabnahme zeigte. Zum einen ist es möglich, dass bei noch höheren Konzentrationen doch eine Inhibition auftritt, zum anderen kann es sein, dass diese Substanzen tatsächlich nur zu einer Stimulation führen. Nachdem *in silico* eine AR- bzw. GR-Bindungsstelle in der Promotorregion des SOAT festgestellt werden konnte (Tab. 4.2), ist es auffällig, dass diese erste Gruppe sowohl Testosteron und Androstendion als auch die vier Glukokortikoide Cortisol, Corticosteron, Prednison, und Prednisolon beinhaltet. Aus zeitlichen Gründen, die Präinkubation mit der stimulierenden Substanz dauerte nur 5 min, kann eine Stimulation des SOAT auf Proteinebene durch eine Transkriptionsfaktor-abhängige Promotoraktivierung ausgeschlossen werden. Trotzdem sollten Messungen mit verschiedenen Zeitpunkten der Präinkubation durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede aufzudecken.

In Gruppe 2 (Abb. 4.47) überlagern sich konzentrationsabhängig zwei Kurven; bei niedrigen Konzentrationen zeigt sich eine stimulierende Kurve, die bei steigenden Konzentrationen von einer inhibierenden Kurve abgelöst wird. Zwei Substrate von SOAT sind in Gruppe 2 vertreten, E₁S und PREGS, die im Unterschied zu allen anderen stimulativen Substanzen

bereits bei 1 μM ein Maximum an Steigerung des SOAT-spezifischen Transports von DHEAS in die Zellen erreichten und bei steigenden Konzentrationen den Transport fast vollständig kompetitiv hemmten. Dieses Resultat kann leider nicht dafür herangezogen werden, um in Zukunft weitere nicht radioaktiv-markierte erhältliche Substrate von SOAT aufzuspüren, denn TLC, als in dieser Arbeit erstmals nachgewiesenes Substrat, zeigte eine Hemmung ohne stimulierenden Effekt (Abb. 4.36). Möglich wäre, dass SOAT zwei Bindestellen besitzt, eine für sulfatierte Steroidhormone und eine zweite für spezifische Gallensäuren wie TLC, oder dass dieselbe Bindetasche von allen Substraten benutzt wird und der unterschiedliche Effekt dadurch auftritt, dass im selben Pharmakophormodell verschiedene Bereiche ausgefüllt werden. Weitere stimulierende Substanzen aus Gruppe 2 wie z.B. DHEA oder der Steroidsulfatasehemmer STX64 zeigten eine Stimulation; da für DHEA kein SOAT-spezifischer Transport festgestellt werden konnte ist es vorstellbar, dass diese Substanzen allosterisch eine Stimulation hervorrufen können, gleichzeitig aber an der Substratbindungsstelle kompetitiv binden.

Bemerkenswert ist das Ergebnis, dass fast alle Gallensäuren mit einer trans-trans-trans-Konformation eine gute Inhibition des DHEAS-Transports durch SOAT zeigten, aber nur eine, die sekundäre Gallensäure Hyodeoxycholat, den Transport stimulierte. Dagegen hemmte bei den Steroidhormonen mit ihrer cis-trans-trans Konformation des Steroidgerüsts nur Cortison und Substrate bzw. eventuelle Substrate (Estradiol-3-sulfat, Estradiol-3,17-disulfat, E₁S, PREGS) die DHEAS-Aufnahme des SOAT, der überwiegende Teil zeigte aber eine stimulierende Wirkung.

Interessant wäre deshalb die Erstellung eines Hemmprofils von radioaktiv-markiertem TLC mit verschiedenen Konzentrationen von Gallensäuren und Steroidhormonen, um festzustellen, ob ein umgekehrter Mechanismus mit stimulierenden Gallensäuren und inhibierenden Steroiden stattfindet. Außerdem sollten unter stimulierenden Bedingungen Michaelis-Menten Kinetiken bestimmt werden, um Veränderungen in der Affinität bzw. Kapazität zu erkennen.

Dadurch, dass DHEA und Testosteron eine Stimulation bewirken, Androsteron, Dihydrotestosteron und Estrogene jedoch nicht, lassen sich anhand der unterschiedlichen chemischen Gruppen Aussagen treffen, die für eine Stimulierung von Bedeutung sind (Abb. 5.12):

- 1) Durch eine Doppelbindung am A- Ring von Position 4 bis 5 (z.B. DHEA) oder am B- Ring an Position 6 bis 7 (z.B. Testosteron) des Steroidgerüsts entsteht eine hydrophobe Region, die für eine Stimulation von Bedeutung zu sein scheint, und bei den nicht stimulierenden Substanzen Androsteron und DHT nicht vorhanden ist.

- 2) Bei den Estrogenen bewirkt eine Verstärkung der Hydrophobizität durch Aromatisierung des A-Rings und/oder eine fehlende Methylgruppe an Position 19 einen Verlust der erhöhten Akkumulation von DHEAS in den Zellen.
- 3) Keine Rolle scheint das Ersetzen einer Hydroxygruppe als Wasserstoffbrückendonator durch eine Ketongruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor an Position 3 oder 17 zu spielen (z.B. DHEA und Testosteron); nicht getestetes Androstendiol mit einer Hydroxygruppe an Position 3 und 17 sollte demnach auch eine stimulierende Wirkung besitzen.

Bei den stimulierenden Substanzen Prednison, Cortisol und Prednisolon lässt sich im Vergleich zum nicht stimulierenden Cortison folgendes feststellen:

- 4) Ein Keton als Wasserstoffbrückenakzeptor an Position 11 verhindert eine Stimulation und führt, wahrscheinlich durch Einfügen in das SOAT-Pharmakophormodell, zu einer Inhibition (Cortison).
- 5) Dieser Effekt wird durch Verstärkung der Hydrophobizität durch eine zweite Doppelbindung im A-Ring wieder aufgehoben (Prednison).
- 6) Eine Hydroxygruppe als Wasserstoffbrückendonator, im SOAT-Pharmakophormodell sind keine vorhanden, an Position 11 verhindert die Stimulation nicht, so dass keine zweite Doppelbindung im A-Ring benötigt wird (Cortisol).

Gallensäuren können durch ihre verschiedene Konformität zwar nicht direkt mit Steroidhormonen verglichen werden, aber eine Stimulierung von Hyodeoxycholat im Gegensatz zum nicht stimulierenden Hyocholat und allen anderen getesteten nicht inhibierenden Gallensäuren zeigt:

- 7) Eine Hydroxygruppe als Wasserstoffbrückendonator an Position 6, die eventuell mit der in Punkt 6 genannten übereinstimmt und die für eine Stimulation bei Gallensäuren eine wichtige Rolle spielt (Lithocholat ohne Wasserstoffbrückendonator an Position 6 inhibiert den SOAT), wird durch eine zusätzliche an Position 7 liegende Hydroxygruppe in Bezug auf den stimulierenden Effekt neutralisiert.

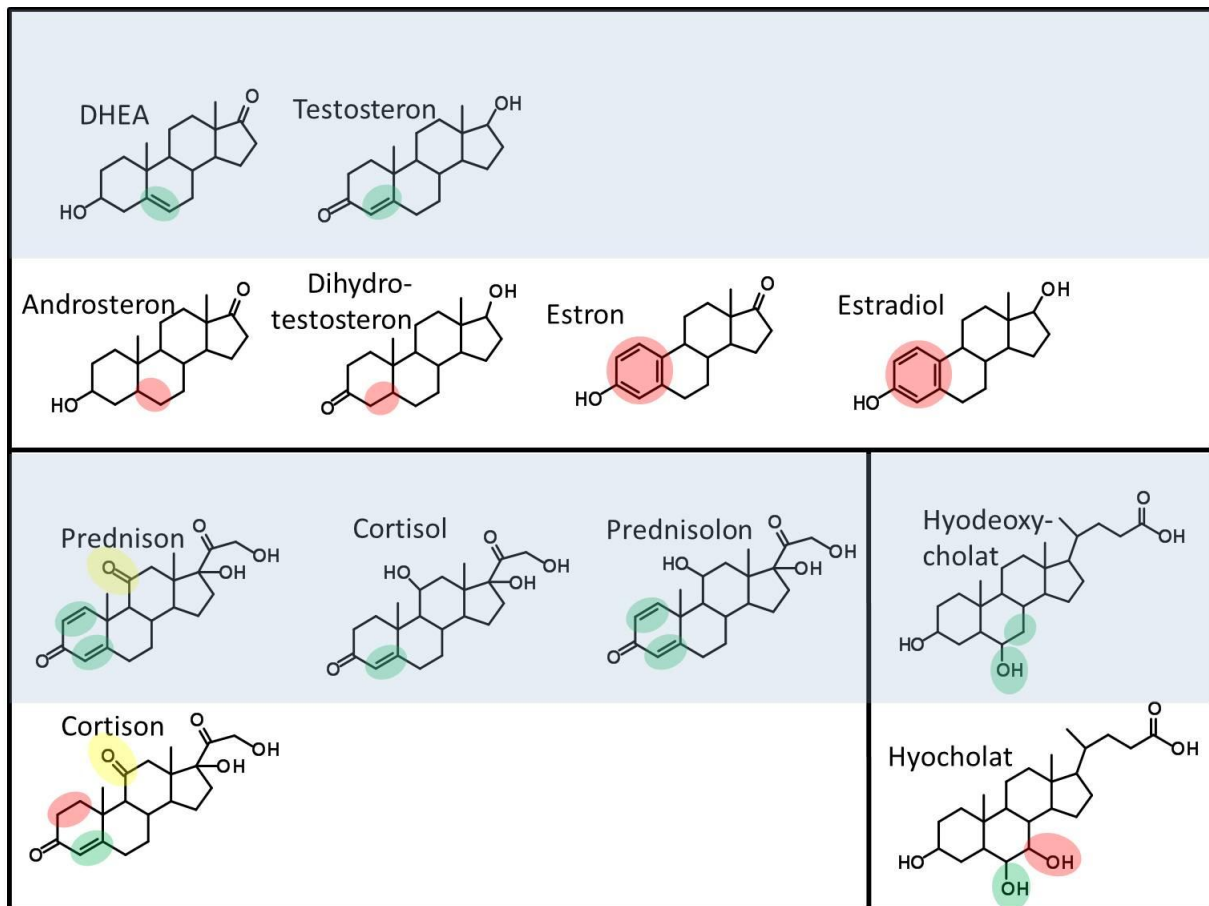


Abb. 5.12: Vergleich der funktionellen Gruppen und Bereiche, die für eine Stimulation des SOAT verantwortlich sind. Grau unterlegt sind die Substanzen, bei denen eine Stimulation des DHEAS-Transports in HEK293-Zellen festgestellt wurde; die mit weißem Hintergrund zeigten keine Stimulation. Grün: für eine Stimulation erforderlich. Gelb: wirkt sich negativ auf eine Stimulation aus, Effekt kann aber aufgehoben werden. Rot: verhindert eine Stimulation.

5.4.5.2 Theorien zur Stimulation

Die Frage stellt sich, welche Mechanismen bei der Beschleunigung des Transportvorgangs eine Rolle spielen könnten. Die Publikationslage von Stimulationen bei Transportproteinen ist insgesamt dünn. Für einen Natrium-unabhängigen Transporter von sulfatierten Steroidhormonen, dem *organic anion transporting polypeptide 2B1* (OATP2B1/SLC21A9), der vor allem in der Leber, aber auch in der Plazenta und Brustdrüse exprimiert wird (Kullak-Ublick et al. 2001; Pizzagalli et al. 2003, Tamai et al. 2000), wurde eine Stimulierung der Aufnahme von DHEAS und E₁S durch Progesteron, aber eine Inhibition durch Testosteron nachgewiesen (Grube et al. 2006). Wegen seiner Expression in hormonabhängigen Geweben wird diskutiert, dass OATP2B1 für die Aufnahme von Präkursormolekülen wie DHEAS, die für eine weitere Steroidhormonsynthese benötigt werden, verantwortlich ist (Ugele et al. 2003). Grube et al. weisen auf eine möglicherweise wichtige Regulierung der Aufnahme von DHEAS und E₁S durch Progesteron in der Plazenta hin. In einer aktuellen Veröffentlichung (Koenen et al. 2012) wurde gezeigt, dass selektiv der Transport der Substrate DHEAS und E₁S durch Progesteron und Dexamethason stimuliert wird, die Aufnahme der Substrate BSP, Atorvasta-

tin und Glibenclamid jedoch nicht. Außerdem wurde gezeigt, dass dieser steroidhormon-abhängige Effekt spezifisch für den OATP2B1 auftrat, während bei OATP1B1, OATP1B3 und OATP1A2 keine Stimulation in Gegenwart von Progesteron zu beobachten war. Beim Oatp1a4 der Ratte wurde festgestellt, dass der Transport des Substrats Digoxin durch Estradiol-17 β -D-glucuronid gehemmt, der Transport durch TC dagegen konzentrationsabhängig stimuliert wurde, weshalb die Autoren von zwei verschiedenen Substratbindestellen ausgehen (Sugiyama et al. 2002). Expressionsunterschiede durch Transkriptionsregulation oder post-translationale Modifizierungen würden eine Stimulation bei allen Substraten hervorrufen und sind auszuschließen (Roth et al. 2011). An hOAT3-exprimierenden Oozyten wurde gezeigt, dass hOAT3 nicht nur als Uniporter, sondern auch als Exchanger fungieren kann (Bakhiya et al. 2003). Dazu wurde das radioaktiv-markierte Substrat Glutarat in die Oozyten injiziert; in extrazellulärem Medium hinzugefügte Substanzen wie z.B. α -Ketoglutarat und Urat, die cis-inhibitorisch aktiv waren, zeigten einen trans-stimulierenden Effekt.

Folgende Theorien sollten in Bezug auf den SOAT bedacht werden:

- 1) Eine hohe Expression von SOAT wurde in hormonabhängigen Geweben wie Hoden und Plazenta nachgewiesen (Geyer et al. 2007). Für Testosteron, im Gegensatz zu DHT, konnte in dieser Arbeit eine Stimulation des Transports von DHEAS durch SOAT bewiesen werden. Da reichlich Testosteron (6–7 mg/d) im Hoden produziert wird (Weinbauer et al. 2010) und eine hohe Expression von SOAT im Hoden demonstriert wurde, könnte mit Beginn der Pubertät eine Stimulation der DHEAS-Aufnahme zu einer erhöhten Bereitstellung von Substrat zur Synthese von noch mehr Testosteron führen, so dass eine Art stimulierender Kreislauf entsteht. In diesem Fall müssen alle erforderlichen Enzyme, die für die Umsetzung von DHEAS in Testosteron benötigt werden, in Keimzellen, in denen mSoat und SOAT exprimiert werden, vorhanden sein.

Die relativ hohe Expression des SOAT in der Plazenta, einhergehend mit dem Resultat, dass Progesteron den SOAT-spezifischen Transport von DHEAS verstärkt, könnte, wie beim OATP2B1 vermutet, durch vermehrte Aufnahme von Präkursormolekülen wie DHEAS zur weiteren Synthese von unkonjugierten Steroidhormonen führen. Somit könnte während der Schwangerschaft die Stimulation eine relevante Rolle spielen, in der die Plazenta selbst hohe Progesteron- und Estrogenkonzentrationen zum Erhalt der Schwangerschaft produziert. In plazentarem Gewebe wurde eine Progesteronkonzentration von durchschnittlich 1720 ng/g Plazentagewebe direkt nach der Geburt gefunden (Feinshtein et al. 2010) und hohe lokale Konzentrationen von Progesteron (durchschnittlich 750 nM) wurden im Umbilikalblut nachgewiesen (Baik et al. 2005).

- 2) Eine Stimulierung der Aufnahme von DHEAS könnte durch einen allosterischen Mechanismus hervorgerufen werden, bei welchem das Stimulanz an einer anderen Stelle als das Substrat an das Transportprotein bindet und so nicht-kompetitiv zu einer Konformationsänderung führt, die den Transport des Substrats begünstigt. In diesem Fall sollte die Affinität des Substrats zum Transportprotein gleich bleiben und sich durch den beschleunigten Transport nur die Kapazität mit einem höheren V_{\max} -Wert ändern (Abb. 5.13). Abzuklären wäre, ob SOAT *cis* oder *trans* stimuliert wird und ob er analog zum hOAT3 als Exchanger fungieren kann; dies würde bedeuten, dass DHEAS von extrazellulärer *Cis*-Seite durch SOAT aufgenommen wird und z.B. in der Zelle vorhandenes Testosteron oder Progesteron von der *Trans*-Seite intrazellulär bindet und somit entweder eine Konformationsänderung oder der beladene Zustand des Proteins zu einer Erhöhung des DHEAS-Transports führt. Eine Stimulierung an der Bindungsstelle des Substrats ist vom logischen Standpunkt her auszuschließen, da die Affinität des Substrats durch den kompetitiven Mechanismus durch eine Hemmung erniedrigt sein müsste (höherer K_m -Wert).

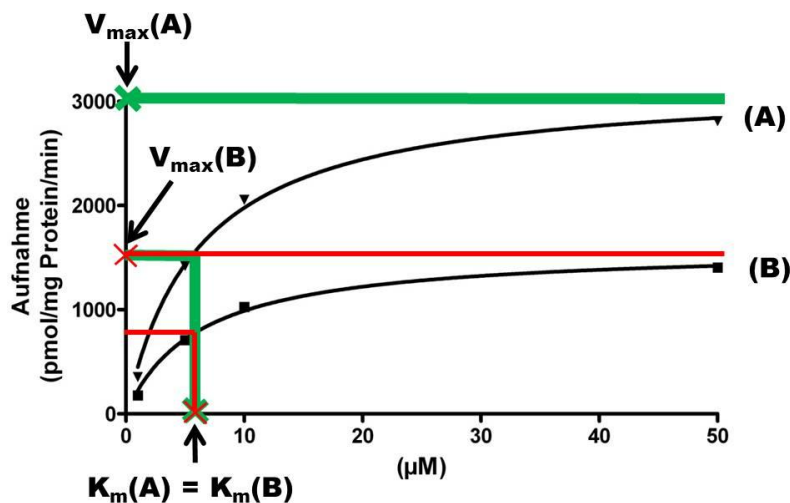


Abb. 5.13: Beispielhafte Berechnung der Michaeliskonstante K_m bei normaler Aufnahme eines Substrats (B) bzw. bei Zugabe einer stimulativen Substanz (A) unter Voraussetzung eines allosterischen Mechanismus. Die erreichten V_{\max} -Werte von (A) und (B) unterscheiden sich deutlich. Die K_m -Werte ergeben sich als Schnittpunkt von $1/2 V_{\max}$ und der Sättigungshyperbel und sind bei (A) und (B) gleich.

- 3) TLC konnte als neues Substrat des SOAT nachgewiesen werden. Bei den Substanzen, die eine Stimulation bzw. Inhibition des DHEAS-Transports herbeiführten, sollten die Transportversuche mit TLC als Substrat wiederholt werden. Wenn Inhibitoren des

DHEAS-Transports den TLC-Transport stimulieren, oder umgekehrt stimulierende Substanzen des DHEAS-Transports die Aufnahme von TLC hemmen, kann von zwei unterschiedlichen Substratbindungsstellen ausgegangen werden. Zusätzlich sollte durch gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren (*site-directed mutagenesis*) versucht werden, die an einer Stimulation, bzw. Inhibition beteiligten Aminosäuren zu ermitteln.

Die stimulatorischen Mechanismen bei Transportern wurden bisher nicht aufgeklärt. Bei den Enzymen, die Gemeinsamkeiten zu Transportern, wie z.B. einen ähnlichen konzentrations-abhängigen Sättigungsverlauf nach Michaelis-Menten, aufweisen, wird zwischen verschiedenen Formen von Stimulatoren unterschieden (Schwartz und Holst 2007), die eventuell auf Transporter übertragen werden könnten, wenn der Agonist eines Enzyms dem Substrat eines Transporters gleichgesetzt wird (Abb. 5.14):

- 1) Ein Ago-allosterischer Modulator ist ein Ligand, welcher als Agonist an der orthosterischen (also an der Haupt-) Bindestelle binden kann, aber zusätzlich als allosterischer Modulator an einer zweiten *Cis*- oder *Trans*-Bindestelle den Effekt eines weiteren Agonisten bzw. den eigenen agonistischen Effekt stimulativ oder inhibitorisch beeinflussen kann. Am Beispiel SOAT könnten die Substrate E_1S und PREGS als ago-allosterische Modulatoren fungieren, wenn der gezeigte stimulierende Effekt durch allosterische Bindung bewirkt wird.
- 2) Allosterische *Enhancer* sind Stimulatoren, die selbst keine Wirkung an der orthosterischen Bindestelle haben, sondern durch allosterische *Cis*- oder *Trans*-Bindung zu einer erhöhten Affinität und/oder höheren Effizienz des Agonisten führen. Unter Umständen könnte die in Abb. 4.46. gezeigte Gruppe 1, die Testosteron und Progesteron beinhaltet, aus allosterische *Enhancern* des SOAT bestehen.
- 3) Von einem Allosterischen Promotor spricht man, wenn ein endogener Agonist an der orthosterischen *Cis*-Bindestelle des einen Heterodimer-Proteinanteils bindet, während der allosterische Promotor an der *Cis*- oder *Trans*-Bindestelle eines weiteren dimerisierenden Proteins bindet und so einen positiven Effekt bewirkt. Beim SOAT konnte *in vitro* eine Heterodimerbildung mit dem NTCP gezeigt werden (Bijsmans et al. 2012), so dass eine hetero- oder eventuell auch homodimere Stimulierung nicht auszuschließen ist.

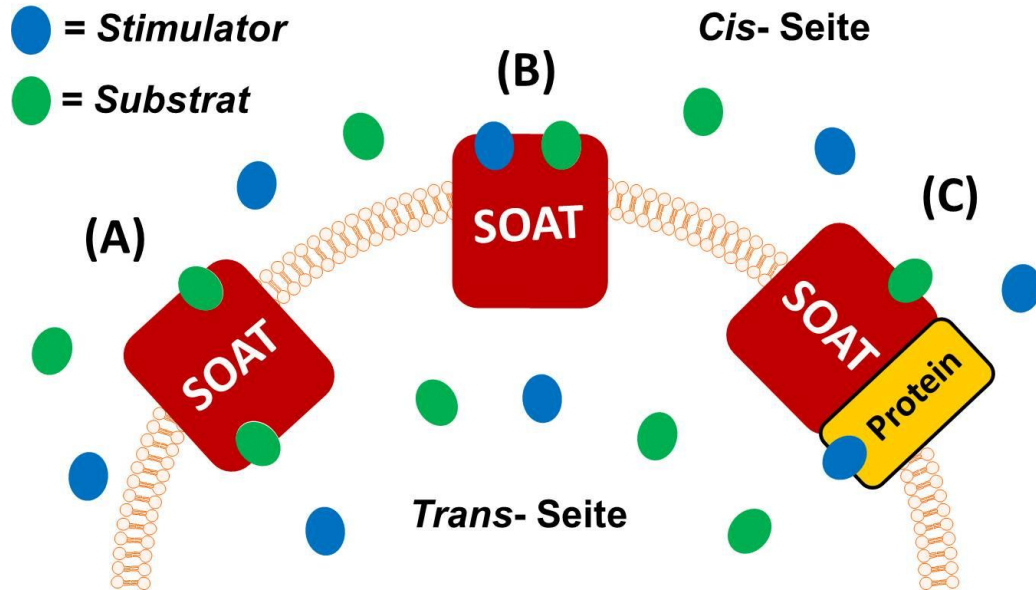


Abb. 5.14: Theorie der *Trans*- und *Cis*-Stimulation des SOAT. Werden auf extrazellulärer (*Cis*-) Seite Substrat und die stimulatив aktive Substanz zugefügt, wird das hydrophilere Substrat, welches auf einen Transporter angewiesen ist, durch SOAT in die Zelle transportiert, während die stimulatив aktive Substanz entweder, bedingt durch seine Lipophilität (z.B. Testosteron), die Zellmembran passiert oder ebenso durch Transport in die Zelle gelangt (z.B. PREGS oder E₁S). Bei der *Trans*-Stimulierung bindet das Stimulanz intrazellulär, bei der *Cis*-Stimulierung auf der gleichen extrazellulären Seite wie das Substrat. **(A)** zeigt die Funktionsweise eines Ago-allosterischen Modulators mit orthosterischer *Cis*-Bindung und allosterischer *trans*-stimulierender Bindestelle. **(B)** zeigt eine orthosterische *Cis*-Bindung des Substrats und *Cis*-Bindung eines allosterischen Enhancers. **(C)** zeigt eine Heterodimerbildung des SOAT mit einem weiteren Protein mit *Cis*-Bindung des Substrats am SOAT und *Trans*-Stimulation des allosterischen Promotors am dimerisierenden Protein; alternativ wäre auch eine SOAT-Homodimerbildung mit *Cis*- oder *Trans*-Stimulierung möglich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die physiologische Rolle des humanen SOAT (SLC10A6), welcher sulfatierte Steroidhormone wie DHEAS, E₁S und PREGS transportiert und im Hoden stark exprimiert wird, ist derzeit noch unklar. Zur Aufklärung ist daher die Generierung einer *Knockout*-Maus angedacht, weshalb der Soat der Maus (mSoat) kloniert und funktionell charakterisiert wurde, um eine Übertragbarkeit der erhaltenen Ergebnisse auf den Mensch zu gewährleisten. Die Resultate der quantitativen RT-PCR zeigten eine sehr hohe mSoat-Expression in der Lunge und eine hohe Expression in Hoden und Haut. Immunhistochemische Untersuchungen führten zu einer spezifischen Anfärbung der Bronchialepithelzellen in der Lunge, der pachytänen primären Spermatozyten im Hoden, der Epidermis der Haut und dem Urothel der Blase. Aufnahmeversuche an stabil transfizierten mSoat-HEK293-Zellen zeigten dasselbe Substratspektrum des humanen SOAT; die Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetiken ließ jedoch eine deutliche Präferenz des mSoat zum PREGS als Substrat erkennen. Zusammengefasst kann der Soat der Maus, trotz Unterschieden in der Genexpression und den Transportaffinitäten, als homologer Transporter des humanen SOAT angesehen werden.

Durch eine RACE-PCR wurde die Soat-Sequenz vom Schwein bestimmt (susSoat). Ein Aminosäurevergleich weist eine höhere Sequenzidentität des humanen SOAT zum susSoat (82,2 %) als zum mSoat (71 %) auf. Durch quantitative RT-PCR konnte eine 465-fache Erhöhung der susSoat-Expression im Hoden eines 250 Tage alten geschlechtsreifen Schweins gegenüber dem Hoden eines präpubertären 50 Tage alten Schweins festgestellt werden. In Verbindung mit der dargestellten Proteinexpression in pachytänen primären Spermatozyten bei der Maus spricht dies für eine Rolle von SOAT im Hoden ab der Pubertät.

Zwei weitere wichtige Mitglieder der SLC10-Familie, zu der auch SOAT zählt, weisen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren zwischen Leber und Dünndarm auf, der ASBT und der NTCP. Trotz der hohen phylogenetischen Verwandtschaft zum SOAT zeigen sich deutliche Unterschiede in der Substratspezifität. Während NTCP sowohl sulfatierte Steroidhormone als auch Gallensäuren und glukuronidiertes Estron transportiert, erkennt ASBT nur Gallensäuren als Substrat, SOAT dagegen nur sulfatierte Steroidhormone. Erstmals konnte jedoch ein Substrat für alle drei Transporter entdeckt werden, das Tauroolithocholat (TLC); demnach müssen bei der Substraterkennung die Bindungsstellen Gemeinsamkeiten aufweisen. Sowohl DHEAS als auch TLC wurden vom SOAT als Substrat erkannt; eine Erklärung hierfür wäre, dass bei einer Überlagerung der beiden Substrate die räumlichen Strukturen der Sulfat- bzw. Sulfongruppe annähernd passend übereinander gelegt werden können. Lithocholat, unkonjugierte Steroide und glukuronidiertes Estradiol wurden von keinem der drei Transporter aufgenommen.

Zur Generierung eines SOAT-Pharmakophormodells wurden mehr als 100 Substanzen auf ihre Inhibition der DHEAS-Aufnahme in SOAT-HEK293-Zellen überprüft. Die 3D-QSAR SOAT-Pharmakophore, berechnet durch den *Catalyst* Algorithmus, besteht aus fünf charakteristischen Bereichen. Tauroolithocholat-3-sulfat, ein potenter Inhibitor des SOAT-Transports, erfüllt alle fünf dieser Kriterien: a) drei hydrophobe Bereiche, eine am A-Ring und zwei an den Methylgruppen an Position 18 und 21 des Gallensäuregerüsts; b) die Sulfatgruppe an Position 3 und die Sulfongruppe des Taurins fungieren als Wasserstoffbrückenakzeptoren. Zu den bereits existierenden Pharmakophormodellen des ASBT und NTCP konnten so Gemeinsamkeiten, aber auch spezifische Unterschiede festgestellt werden.

Ingesamt achtzehn Substanzen, darunter Testosteron und Progesteron, führten zu einer konzentrationsabhängigen Stimulierung des SOAT-Transports von DHEAS. Eine physiologische Rolle der Stimulation ist möglich, da z.B. reichlich Testosteron im Hoden produziert wird und eine hohe Expression von SOAT im Hoden demonstriert wurde. So könnte mit Beginn der Pubertät eine Stimulation der DHEAS-Aufnahme durch Testosteron zu einer erhöhten Bereitstellung von DHEAS in der Zelle führen. Durch eine erhöhte Synthese von Testosteron aus DHEAS könnte auf diese Weise ein stimulierender Kreislauf entstehen.

7 SUMMARY

The physiological role of the human SOAT (SLC10A6), which is highly expressed in testis and transports sulfoconjugated steroid hormones is not well understood yet. Therefore, a knockout mouse model was considered that may elucidate the biological significance of this process for reproduction and other hormone dependent processes. However, a prerequisite for this purpose is the cloning of Soat from the mouse (mSoat) and its thorough expression analysis and functional characterization in order to assess the transferability of the results to the situation in humans. Quantitative mRNA expression analysis for mSoat revealed very high expression in lung and further high expression in testis and skin. Immunohistochemical studies showed expression of the mSoat protein in bronchial epithelial cells of the lung, in pachytene primary spermatocytes within the seminiferous tubules of the testis, in the epidermis of the skin as well as in the urinary epithelium of the bladder. Stably transfected mSoat-HEK293 cells revealed sodium-dependent transport for the same substrates as the human SOAT, but determination of Michaelis-Menten kinetics demonstrated a preference to PREGS as substrate for mSoat. In conclusion, some differences between SOAT and mSoat exist in the quantitative gene expression in endocrine and non-endocrine tissues as well as in the transport kinetics for steroid sulfates, but in general mSoat can be regarded as homologous carrier for SOAT.

Additionally, the Soat mRNA sequence of the pig (susSoat) was determined via RACE-PCR. A comparison of the amino acid sequences showed a higher identity of human SOAT to susSoat (82.2%) than to mSoat (71%). Quantitative mRNA expression analysis revealed a 465-fold increase of susSoat in the testis of a 250 days old sexually mature boar compared to a 50 days old preadolescent male pig. Associated with the demonstrated mSoat protein expression in pachytene primary spermatocytes a physiological role after puberty can be assumed.

Two further members of the SLC10 family, the NTCP and the ASBT, are important factors for the maintenance of the enterohepatic circulation between the liver and the gut. In spite of a high phylogenetic relationship to SOAT, distinct differences exist in the substrate specificity. While NTCP transports sulfoconjugated steroid hormones, bile acids and Estron-3 β -D-glucuronide, ASBT shows uptake only for bile acids, and SOAT only for sulfated steroids. For the first time, a substrate was discovered for all three transporters: the Tauroolithocholic acid (TLC). Therefore, similarities in the substrate recognition of the binding sites between all three transporters have to exist. For SOAT, a nearly identical steric overlay of the sulfate group of DHEAS and the sulfone group of TLC could explain the substrate recognition of both. Lithocholic acid, unconjugated steroids and Estradiol-17 β D-glucuronide were not transported by any of these three carriers.

For the generation of a pharmacophore model more than 100 compounds were screened for inhibition of DHEAS transport by SOAT-HEK293 cells. The 3D-QSAR SOAT pharmacophore calculated by the CATALYST algorithm consists of five characteristic features. The potent SOAT inhibitor tauroolithocholic acid 3-sulfate (TLCS) mapped all of them: a) three hydrophobic sites, one matches the A-Ring and two the methyl groups at positions 18 and 21 of TLCS; b) the sulfate group at position 3 and the sulfonyl group of the taurine residue act as hydrogen bond acceptors. Comparison with the hitherto existing human ASBT, rabbit Asbt (cAsbt), and NTCP pharmacophore models revealed similarities, but also specific differences.

Alltogether 18 compounds, including testosterone and progesterone, caused a concentration dependent stimulation of DHEAS uptake. A physiological role of an enhanced uptake may be possible. For example, production of testosterone is abundant in testis, where SOAT is highly expressed. So at the beginning of the puberty a stimulation of the DHEAS uptake by testosterone could lead to an elevated supply of DHEAS into the cells. The resulting increase of testosterone synthesis out of DHEAS may lead to a stimulating loop.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Akita H, Suzuki H, Sugiyama Y (2001) Sinusoidal efflux of taurocholate is enhanced in Mrp2-deficient rat liver. *Pharm Res* 18:1119-1125

Akita H, Suzuki H, Hirohashi T, Takikawa H, Sugiyama Y (2002) Transport activity of human MRP3 expressed in Sf9 cells: comparative studies with rat MRP3. *Pharm Res* 19:34-41

Al SW, Mokbel R, Salhab M, Jiang WG, Reed MJ, Mokbel K (2006) The role of STS and OATP-B mRNA expression in predicting the clinical outcome in human breast cancer. *Anti-cancer Res* 26:4985-4990

Alakurtti S, Makela T, Koskimies S, Yli-Kauhialuoma J (2006) Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci* 29:1-13

Alcalay M, Toniolo D (1988) CpG islands of the X chromosome are gene associated. *Nucleic Acids Res* 16:9527-9543

Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinizz JL, Robertson WE, Lasater J, Caligiuri A, Tretjak Z, LeSage GD (1997) Functional expression of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 113:1734-1740

Alpini G, Glaser SS, Ueno Y, Rodgers R, Phinizz JL, Francis H, Baiocchi L, Holcomb LA, Caligiuri A, LeSage GD (1999) Bile acid feeding induces cholangiocyte proliferation and secretion: evidence for bile acid-regulated ductal secretion. *Gastroenterology* 116:179-186

Alpini G, Glaser S, Baiocchi L, Francis H, Xia X, Lesage G (2005) Secretin activation of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter is associated with cholehepatic shunting in rats. *Hepatology* 41:1037-1045

Alvarez J, Shoichet B (2005) *Virtual Screening in Drug Discovery*, CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN 0824754794

Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ (1994) Characterization of cloned rat liver Na⁺(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol* 267:G637-G643

Baik I, Devito WJ, Ballen K, Becker PS, Okulicz W, Liu Q, Delpapa E, Lagiou P, Sturgeon S, Trichopoulos D, Quesenberry PJ, Hsieh CC (2005) Association of fetal hormone levels with stem cell potential: evidence for early life roots of human cancer. *Cancer Res* 65:358-363

Bakhiya A, Bahn A, Burckhardt G, Wolff N (2003) Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. *Cell Physiol Biochem* 13:249-256

Balakrishnan A, Sussman DJ, Polli JE (2005) Development of stably transfected monolayer overexpressing the human apical sodium-dependent bile acid transporter (hASBT). *Pharm Res* 22:1269-1280

Balakrishnan A, Polli JE (2006) Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT, SLC10A2): a potential prodrug target. *Mol Pharm* 3:223-230

Banerjee A, Swaan PW (2006) Membrane topology of human ASBT (SLC10A2) determined by dual label epitope insertion scanning mutagenesis. New evidence for seven transmembrane domains. *Biochemistry* 45:943-953

Baringhaus KH, Matter H, Stengelin S, Kramer W (1999) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. II. A reliable 3D QSAR pharmacophore model for the ileal Na(+)/bile acid cotransporter. *J Lipid Res* 40:2158-2168

Bhat BG, Rapp SR, Beaudry JA, Napawan N, Butteiger DN, Hall KA, Null CL, Luo Y, Keller BT (2003) Inhibition of ileal bile acid transport and reduced atherosclerosis in apoE^{-/-} mice by SC-435. *J Lipid Res* 44:1614-1621

Bijsmans IT, Bouwmeester RA, Geyer J, Faber KN, van de Graaf SF (2012) Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na(+)-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem J* 441:1007-1015

Bjorkhem I, Lutjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A (1997) Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with ¹⁸O₂ techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 272:30178-30184

Böhm HJ, Schneider G (2000) Virtual Screening for Bioactive Molecules, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 3527301534

Bolton EC, So AY, Chaivorapol C, Haqq CM, Li H, Yamamoto KR (2007) Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev* 21:2005-2017

Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-592

Boyer JL, Ng OC, Ananthanarayanan M, Hofmann AF, Schteingart CD, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1994) Expression and characterization of a functional rat liver Na⁺ bile acid cotransport system in COS-7 cells. *Am J Physiol* 266:G382-G387

Brehm R, Zeiler M, Ruttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lecureuil C, Steger K, Konrad L, Biermann K, Failing K, Bergmann M (2007) A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 171:19-31

Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, Marin JJ (2002) Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chlorocholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol* 61:853-860

Bujan L, Mieusset R, Audran F, Lumbroso S, Sultan C (1993) Increased oestradiol level in seminal plasma in infertile men. *Hum Reprod* 8:74-77

Burger S, Doring B, Hardt M, Beuerlein K, Gerstberger R, Geyer J (2011) Co-expression studies of the orphan carrier protein Slc10a4 and the vesicular carriers VACHT and VMAT2 in the rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 193:109-121

Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ (2002) The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123:1649-1658

- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:35
- Chiang JY, Kimmel R, Weinberger C, Stroup D (2000) Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Biol Chem* 275:10918-10924
- Chignard N, Mergey M, Veissiere D, Parc R, Capeau J, Poupon R, Paul A, Housset C (2001) Bile acid transport and regulating functions in the human biliary epithelium. *Hepatology* 33:496-503
- Chignard N, Mergey M, Veissiere D, Poupon R, Capeau J, Parc R, Paul A, Housset C (2003) Bile salts potentiate adenylyl cyclase activity and cAMP-regulated secretion in human gallbladder epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G205-G212
- Christie DM, Dawson PA, Thevananther S, Shneider BL (1996) Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am J Physiol* 271:G377-G385
- Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W (2001) Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76:23-30
- Claus R, Hoffmann B (1980) Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in blood plasma of boars. *Acta Endocrinol (Copenh)* 94:404-411
- Cohn MA, Rounds DJ, Karpen SJ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ (1995) Assignment of a rat liver Na⁺/bile acid cotransporter gene to chromosome 6q24. *Mamm Genome* 6:60
- Conde A, Dhalluin G, Chaumont F, Chaves M, Geros H (2010) Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. *Int J Biochem Cell Biol* 42:857-868
- Conley AJ, Bird IM (1997) The role of cytochrome P450 17 α -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod* 56:789-799
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274:G157-G169
- Cutler GB, Jr., Glenn M, Bush M, Hodgen GD, Graham CE, Loriaux DL (1978) Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology* 103:2112-2118
- Da Silva TC, Hussainzada N, Khantwal CM, Polli JE, Swaan PW (2011) Transmembrane helix 1 contributes to substrate translocation and protein stability of bile acid transporter SLC10A2. *J Biol Chem* 286:27322-27332
- Da VG, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P (2002) Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* 25:1600-1603
- Dawson PA, Oelkers P (1995) Bile acid transporters. *Curr Opin Lipidol* 6:109-114

Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N, Parks JS (2003) Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* 278:33920-33927

Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N (2005) The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 280:6960-6968

Deitcher D (2002) Exocytosis, endocytosis, and development. *Semin Cell Dev Biol* 13:71-76

Dietschy JM, Woollett LA, Spady DK (1993) The interaction of dietary cholesterol and specific fatty acids in the regulation of LDL receptor activity and plasma LDL-cholesterol concentrations. *Ann N Y Acad Sci* 676:11-26

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK (1993) Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 34:1637-1659

Döring B (2010) Molekulare und funktionelle Charakterisierung des humanen Natrium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT), Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, ISBN 978-3-8359-5592-9

Döring B, Lütteke T, Geyer J, Petzinger E (2012) The SLC10 Carrier Family: Transport Functions and Molecular Structure. *Curr Top Membr* 70:105-168

Duvigneau JC, Hartl RT, Groiss S, Gemeiner M (2005) Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* 306:16-27

Eiler H, Graves CN (1977) Oestrogen content of semen and the effect of exogenous oestradiol-17beta on the oestrogen and androgen concentration in semen and blood plasma of bulls. *J Reprod Fertil* 50:17-21

Engst W, Landsiedel R, Hermersdorfer H, Doehmer J, Glatt H (1999) Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 20:1777-1785

Enhsen A, Kramer W, Wess G (1998) Bile acids in drug discovery. *Drug Discov Today* 3:409-418

Espina V, Heiby M, Pierobon M, Liotta LA (2007) Laser capture microdissection technology. *Expert Rev Mol Diagn* 7:647-657

Feinshtein V, Ben-Zvi Z, Sheiner E, Amash A, Sheizaf B, Holcberg G (2010) Progesterone levels in cesarean and normal delivered term placentas. *Arch Gynecol Obstet* 281:387-392

Fernandes CF, Godoy JR, Doring B, Cavalcanti MC, Bergmann M, Petzinger E, Geyer J (2007) The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 361:26-32

Fietz D (2011) Molekularbiologische Untersuchung des CAG-Repeats des humanen Androgenrezeptors und Korrelation mit der Histologie der Spermatogenese – Ist das CAG-Repeat ein molekularer Marker für männliche Infertilität? Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

- Fluck CE, Miller WL, Auchus RJ (2003) The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3762-3766
- Fraczek B, Kotula-Balak M, Wojtusiak A, Pierscinski A, Bilinska B (2001) Cytochrome P450 aromatase in the testis of immature and mature pigs. *Reprod Biol* 1:51-59
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254:497-501
- Funk K (2009) Die Bedeutung des Natrium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT) für den Steroidsulfattransport in der Plazenta und die Pathogenese hormonabhängiger Mammakarzinome, Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Lauferweiler Verlag, ISBN 3-8359-5414-8
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M (2007) Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773:283-308
- Geisler J (2003) Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:245-253
- Geyer J, Godoy JR, Petzinger E (2004) Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 316:300-306
- Geyer J (2005) Ouabaintransporter in Leber und Nebenniere von Ratte und Rind: Klonierung, Charakterisierung und funktionelle Bedeutung. Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Lauferweiler Verlag, ISBN 3-89687-456-X
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E (2006) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:413-431
- Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 282:19728-19741
- Geyer J, Fernandes CF, Döring B, Burger S, Godoy JR, Rafalzik S, Hubschle T, Gerstberger R, Petzinger E (2008) Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152:990-1005
- Giese S, Hossain H, Markmann M, Chakraborty T, Tchatalbachev S, Guillou F, Bergmann M, Failing K, Weider K, Brehm R (2012) Sertoli-cell-specific knockout of connexin 43 leads to multiple alterations in testicular gene expression in prepubertal mice. *Dis Model Mech* 5:895-913
- Glatt H (2000) Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 129:141-170
- Godoy JR, Fernandes C, Döring B, Beuerlein K, Petzinger E, Geyer J (2007) Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur J Cell Biol* 86:445-460

- Green RM, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Beier DR (1998) Genetic mapping of the Na(+)-taurocholate cotransporting polypeptide to mouse chromosome 12. *Mamm Genome* 9:598
- Greupink R, Nabuurs SB, Zarzycka B, Verweij V, Monshouwer M, Huisman MT, Russel FG (2012) In silico identification of potential cholestasis-inducing agents via modeling of Na(+)-dependent taurocholate cotransporting polypeptide substrate specificity. *Toxicol Sci* 129:35-48
- Gross M, Top I, Laux I, Katz J, Curran J, Tindell C, Agus D (2007) Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13:1979-1986
- Grube M, Kock K, Karner S, Reuther S, Ritter CA, Jedlitschky G, Kroemer HK (2006) Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones. *Mol Pharmacol* 70:1735-1741
- Hagenbuch B, Lubbert H, Stieger B, Meier PJ (1990) Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 265:5357-5360
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10629-10633
- Hagenbuch B, Meier PJ (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93:1326-1331
- Hagenbuch B, Meier PJ (1996) Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 16:129-136
- Hagenbuch B (1997) Molecular properties of hepatic uptake systems for bile acids and organic anions. *J Membr Biol* 160:1-8
- Hagenbuch B, Dawson P (2004) The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch*
- Hagenbuch B, Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609:1-18
- Hagenbuch B, Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447:653-665
- Hallén S, Branden M, Dawson PA, Sachs G (1999) Membrane insertion scanning of the human ileal sodium/bile acid co-transporter. *Biochemistry* 38:11379-11388
- Hallén S, Bjorquist A, Ostlund-Lindqvist AM, Sachs G (2002a) Identification of a region of the ileal-type sodium/bile acid cotransporter interacting with a competitive bile acid transport inhibitor. *Biochemistry* 41:14916-14924
- Hallén S, Mareninova O, Branden M, Sachs G (2002b) Organization of the membrane domain of the human liver sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry* 41:7253-7266
- Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW (2006) The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol (Oxf)* 187:61-73
- Hara S, Higaki J, Higashino K, Iwai M, Takasu N, Miyata K, Tonda K, Nagata K, Goh Y, Mizui T (1997) S-8921, an ileal Na⁺/bile acid cotransporter inhibitor decreases serum cholesterol in hamsters. *Life Sci* 60:L-70

- Hata S, Wang P, Eftychiou N, Ananthanarayanan M, Batta A, Salen G, Pang KS, Wolkoff AW (2003) Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: implications for hepatic organic anion uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G829-G839
- Hay JB, Hodgins MB (1973) Metabolism of androgens in vitro by human facial and axillary skin. *J Endocrinol* 59:475-486
- He L, Vasiliou K, Nebert DW (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics* 3:195-206
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch* 447:465-468
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994
- Hernandez-Martin A, Gonzalez-Sarmiento R, De UP (1999) X-linked ichthyosis: an update. *Br J Dermatol* 141:617-627
- Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:52
- Higaki J, Hara S, Takasu N, Tonda K, Miyata K, Shike T, Nagata K, Mizui T (1998) Inhibition of ileal Na⁺/bile acid cotransporter by S-8921 reduces serum cholesterol and prevents atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1304-1311
- Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB (2004) Ethnicity-dependent polymorphism in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J Biol Chem* 279:7213-7222
- Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130:1793-1806
- Hoffmann B, Rostalski A, Mutembei HM, Goericke-Pesch S (2010) Testicular steroid hormone secretion in the boar and expression of testicular and epididymal steroid sulphatase and estrogen sulphotransferase activity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 118:274-280
- Hoffmann R (2001a) Enzymology of the hair follicle. *Eur J Dermatol* 11:296-300
- Hoffmann R, Rot A, Niiyama S, Billich A (2001b) Steroid sulfatase in the human hair follicle concentrates in the dermal papilla. *J Invest Dermatol* 117:1342-1348
- Hofmann AF (2007) Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol* 6:15-27
- Holstein AF, Roosen-Runge EC (1981) Atlas of human spermatogenesis. Grosse, Berlin, pp 58ff
- Hoyer H, Lykkesfeldt G, Ibsen HH, Brandrup F (1986) Ichthyosis of steroid sulphatase deficiency. Clinical study of 76 cases. *Dermatologica* 172:184-190
- Hruz P, Zimmermann C, Gutmann H, Degen L, Beuers U, Terracciano L, Drewe J, Beglinger C (2006) Adaptive regulation of the ileal apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) in patients with obstructive cholestasis. *Gut* 55:395-402

Hu NJ, Iwata S, Cameron AD, Drew D (2011) Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature* 478:408-411

Huang HC, Tremont SJ, Lee LF, Keller BT, Carpenter AJ, Wang CC, Banerjee SC, Both SR, Fletcher T, Garland DJ, Huang W, Jones C, Koeller KJ, Kolodziej SA, Li J, Manning RE, Mahoney MW, Miller RE, Mischke DA, Rath NP, Reinhard EJ, Tollefson MB, Vernier WF, Wagner GM, Rapp SR, Beaudry J, Glenn K, Regina K, Schuh JR, Smith ME, Trivedi JS, Reitz DB (2005) Discovery of potent, nonsystemic apical sodium-codependent bile acid transporter inhibitors (Part 2). *J Med Chem* 48:5853-5868

Huff MW, Telford DE, Edwards JY, Burnett JR, Barrett PH, Rapp SR, Napawan N, Keller BT (2002) Inhibition of the apical sodium-dependent bile acid transporter reduces LDL cholesterol and apoB by enhanced plasma clearance of LDL apoB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1884-1891

Ichihashi T, Izawa M, Miyata K, Mizui T, Hirano K, Takagishi Y (1998) Mechanism of hypocholesterolemic action of S-8921 in rats: S-8921 inhibits ileal bile acid absorption. *J Pharmacol Exp Ther* 284:43-50

Jiang L, Alber J, Wang J, Du W, Yang X, Li X, Sanglard D, Geyer J (2012) The *Candida albicans* plasma membrane protein Rch1p, a member of the vertebrate SLC10 carrier family, is a novel regulator of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *Biochem J* 444:497-502

Jung D, Inagaki T, Gerard RD, Dawson PA, Kliwer SA, Mangelsdorf DJ, Moschetta A (2007) FXR agonists and FGF15 reduce fecal bile acid excretion in a mouse model of bile acid malabsorption. *J Lipid Res* 48:2693-2700

Kagedahl M, Swaan PW, Redemann CT, Tang M, Craik CS, Szoka FC, Jr., Oie S (1997) Use of the intestinal bile acid transporter for the uptake of cholic acid conjugates with HIV-1 protease inhibitory activity. *Pharm Res* 14:176-180

Karakus E (2009) Die Bedeutung des Transporters SOAT (SLC10A6) für die Entwicklung von Estrogen-abhängigen Mammakarzinomen, Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, ISBN 3-8359-5429-6

Kawano A, Payne AH, Jaffe RB (1973) Gonadal steroid sulfates and sulfatase. VI. Comparative metabolism in isolated seminiferous tubules and minces of human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 37:441-447

Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G (2009) Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F1477-F1501

Kim DC, Harrison AW, Ruwart MJ, Wilkinson KF, Fisher JF, Hidalgo IJ, Borchardt RT (1993) Evaluation of the bile acid transporter in enhancing intestinal permeability to renin-inhibitory peptides. *J Drug Target* 1:347-359

Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun AQ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ, Shin DM, Muallem S, Lee MG (2002) Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca²⁺-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 122:1941-1953

Kim RB, Leake B, Cvetkovic M, Roden MM, Nadeau J, Walubo A, Wilkinson GR (1999) Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1204-1209

Kip NS, Lazaridis KN, Masyuk AI, Splinter PL, Huebert RC, LaRusso NF (2004) Differential expression of cholangiocyte and ileal bile acid transporters following bile acid supplementation and depletion. *World J Gastroenterol* 10:1440-1446

Klebe G (2009) Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneimitteln, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN-10: 3827420466

Koenen A, Kock K, Keiser M, Siegmund W, Kroemer HK, Grube M (2012) Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides. *Eur J Pharm Sci* 47:774-780

Kouzuki H, Suzuki H, Ito K, Ohashi R, Sugiyama Y (1998) Contribution of sodium taurocholate co-transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1043-1050

Kouzuki H, Suzuki H, Stieger B, Meier PJ, Sugiyama Y (2000) Characterization of the transport properties of organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) and Na(+)/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp): comparative studies on the inhibitory effect of their possible substrates in hepatocytes and cDNA-transfected COS-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292:505-511

Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringhaus KH, Enhnen A, Glombik H (1992) Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J Biol Chem* 267:18598-18604

Kramer W, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Jouvenal K, Muller G, Tripiel D, Wess G (1993) Intestinal bile acid absorption. Na(+)-dependent bile acid transport activity in rabbit small intestine correlates with the coexpression of an integral 93-kDa and a peripheral 14-kDa bile acid-binding membrane protein along the duodenum-ileum axis. *J Biol Chem* 268:18035-18046

Kramer W, Wess G, Enhnen A, Bock K, Falk E, Hoffmann A, Neckermann G, Gantz D, Schulz S, Nickau L (1994a) Bile acid derived HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1227:137-154

Kramer W, Wess G, Neckermann G, Schubert G, Fink J, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringhaus KH, Boger G (1994b) Intestinal absorption of peptides by coupling to bile acids. *J Biol Chem* 269:10621-10627

Kramer W, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S (1995) Radiation-inactivation analysis of the Na+/bile acid co-transport system from rabbit ileum. *Biochem J* 306 (Pt 1):241-246

Kramer W, Wess G (1996) Bile acid transport systems as pharmaceutical targets. *Eur J Clin Invest* 26:715-732

Kramer W, Wess G, Bewersdorf U, Corsiero D, Girbig F, Weyland C, Stengelin S, Enhnen A, Bock K, Kleine H, Le Dreau MA, Schafer HL (1997a) Topological photoaffinity labeling of the rabbit ileal Na+/bile-salt-cotransport system. *Eur J Biochem* 249:456-464

Kramer W, Wess G, Enhnen A, Falk E, Hoffmann A, Neckermann G, Schubert G, Urmann M (1997b) Modified bile acids as carriers for peptides and drugs. *J Control Release* 46:17-30

Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhnen A, Heuer H, Becker W, Corsiero D, Girbig F, Noll R, Weyland C (1999) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res* 40:1604-1617

Kramer W, Girbig F, Glombik H, Corsiero D, Stengelin S, Weyland C (2001a) Identification of a ligand-binding site in the Na+/bile acid cotransporting protein from rabbit ileum. *J Biol Chem* 276:36020-36027

Kramer W, Sauber K, Baringhaus KH, Kurz M, Stengelin S, Lange G, Corsiero D, Girbig F, König W, Weyland C (2001b) Identification of the bile acid-binding site of the ileal lipid-binding protein by photoaffinity labeling, matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, and NMR structure. *J Biol Chem* 276:7291-7301

Kramer W, Glombik H (2006) Bile acid reabsorption inhibitors (BARI): novel hypolipidemic drugs. *Curr Med Chem* 13:997-1016

Kramer W (2011) Transporters, Trojan horses and therapeutics: suitability of bile acid and peptide transporters for drug delivery. *Biol Chem* 392(1-2):77-94

Kubinyi H (2001) Der Wandel in der Arzneimittelforschung, Nr.59, Forschung für Leben

Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G (1997) Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113:1295-1305

Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533

Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126:322-342

Kurata H, Suzuki S, Ohhata Y, Ikeda T, Hasegawa T, Kitayama K, Inaba T, Kono K, Kohama T (2004) A novel class of apical sodium-dependent bile acid transporter inhibitors: the amphiphilic 4-oxo-1-phenyl-1,4-dihydroquinoline derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1183-1186

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28:655-661

Laatikainen T, Laitinen EA, Vihko R (1971) Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 32:59-64

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J (2001) DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 22:185-212

Lambard S, Galeraud-Denis I, Bouraima H, Bourguiba S, Chocat A, Carreau S (2003) Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. *Mol Hum Reprod* 9:117-124

Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF (1997) Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 100:2714-2721

Lazaridis KN, Tietz P, Wu T, Kip S, Dawson PA, LaRusso NF (2000) Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11092-11097

Le GC, Sananes N, Gouezou M, Takemori S, Kominami S, Baulieu EE, Robel P (1991) Immunoreactive cytochrome P-450(17 α) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain. *J Reprod Fertil* 93:609-622

Lekhkota O, Brehm R, Claus R, Wagner A, Bohle RM, Bergmann M (2006) Cellular localization of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and -beta (ERbeta) mRNA in the boar testis. *Histochem Cell Biol* 125:259-264

Leslie EM, Watkins PB, Kim RB, Brouwer KL (2007) Differential Inhibition of Rat and Human Na⁺-Dependent Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP/SLC10A1) by Bosentan: A Mechanism for Species Differences in Hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1170-1178

Lewis MC, Brieady LE, Root C (1995) Effects of 2164U90 on ileal bile acid absorption and serum cholesterol in rats and mice. *J Lipid Res* 36:1098-1105

Li H, Xu G, Shang Q, Pan L, Shefer S, Batta AK, Bollineni J, Tint GS, Keller BT, Salen G (2004) Inhibition of ileal bile acid transport lowers plasma cholesterol levels by inactivating hepatic farnesoid X receptor and stimulating cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Metabolism* 53:927-932

Life Technologies Application Note: Using TaqMan® (2012) Endogenous Control Assays to select an endogenous control for experimental studies; URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/cms_042279.pdf

Lionarons DA, Boyer JL, Cai SY (2012) Evolution of substrate specificity for the bile salt transporter ASBT (SLC10A2). *J Lipid Res* 53:1535-1542

Lischka K, Starke D, Failing K, Herling A, Kramer W, Petzinger E (2003) Hepatobiliary elimination of bile acid-modified oligodeoxynucleotides in Wistar and TR- rats: evidence for mrp2 as carrier for oligodeoxynucleotides. *Biochem Pharmacol* 66:565-577

Longcope C (1996) Dehydroepiandrosterone metabolism. *J Endocrinol* 150 Suppl:S125-S127

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

Lundasen T, Andersson EM, Snaith M, Lindmark H, Lundberg J, Ostlund-Lindqvist AM, Angelin B, Rudling M (2012) Inhibition of intestinal bile acid transporter Slc10a2 improves triglyceride metabolism and normalizes elevated plasma glucose levels in mice. *PLoS One* 7:e37787

Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH (2009) Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol* 30:65-91

Mareninova O, Shin JM, Vagin O, Turdikulova S, Hallén S, Sachs G (2005) Topography of the membrane domain of the liver Na⁺-dependent bile acid transporter. *Biochemistry* 44:13702-13712

Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F (1994) Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol Cell Endocrinol* 104:103-111

Meier M, Moller G, Adamski J (2009) Perspectives in understanding the role of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1155:15-24

Meier PJ, Stieger B (2002) Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64:635-661

- Melnyk PM, Sanford LM, Robaire B (1992) Moderate increases in peripheral blood estradiol concentration in the adult ram do not directly inhibit testosterone secretion. *Can J Physiol Pharmacol* 70:1384-1391
- Mikkonen L, Pihlajamaa P, Sahu B, Zhang FP, Janne OA (2010) Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Mol Cell Endocrinol* 317:14-24
- Milewich L, Garcia RL, Johnson AR (1983) Steroid sulfatase activity in human lung tissue and in endothelial pulmonary cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 57:8-14
- Milewich L, Garcia RL, Gerrity LW (1984) Steroid sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase activities in mouse tissues. *J Steroid Biochem* 21:529-538
- Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y (2006) Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34:1575-1581
- Montagnani M, Love MW, Rossel P, Dawson PA, Qvist P (2001) Absence of dysfunctional ileal sodium-bile acid cotransporter gene mutations in patients with adult-onset idiopathic bile acid malabsorption. *Scand J Gastroenterol* 36:1077-1080
- Montagnani M, Abrahamsson A, Galman C, Eggertsen G, Marschall HU, Ravaioli E, Einarsson C, Dawson PA (2006) Analysis of ileal sodium/bile acid cotransporter and related nuclear receptor genes in a family with multiple cases of idiopathic bile acid malabsorption. *World J Gastroenterol* 12:7710-7714
- Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP (2009) Betulin is a potent anti-tumor agent that is enhanced by cholesterol. *PLoS One* 4:e1
- Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP (2010) Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. *Anticancer Drugs* 21:215-227
- Mutembei HM, Pesch S, Schuler G, Hoffmann B (2005) Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reprod Domest Anim* 40:228-236
- Mutembei HM, Kowalewski MP, Ugele B, Schuler G, Hoffmann B (2009) Expression and activity of steroid sulphatase in the boar testis. *Reprod Domest Anim* 44:17-23
- Nishimura M, Naito S (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20:452-477
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM (1993) Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 132:1396-1401
- Noe J, Stieger B, Meier PJ (2002) Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 123:1659-1666
- Nygard AB, Jorgensen CB, Cirera S, Fredholm M (2007) Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 8:67
- Oelkers P, Dawson PA (1995) Cloning and chromosomal localization of the human ileal lipid-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1257:199-202

- Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA (1997) Primary Bile Acid Malabsorption Caused by Mutations in the Ileal Sodium-dependent Bile Acid Transporter Gene (SLC10A2á). *J Clin Invest* 99:1880
- Overpeck JG, Colson SH, Hohmann JR, Applestine MS, Reilly JF (1978) Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: a literature survey. *J Toxicol Environ Health* 4:785-803
- Pasqualini JR, Chetrite GS (2005) Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:221-236
- Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ (2005) Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol* 43:342-357
- Payne AH, Jaffe RB, Abell MR (1971) Gonadal steroid sulfates and sulfatase. 3. Correlation of human testicular sulfatase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase, histologic structure and serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 33:582-591
- Payne AH (1972) Gonadal steroid sulfates and sulfatase. V. Human testicular steroid sulfatase: partial characterization and possible regulation by free steroids. *Biochim Biophys Acta* 258:473-483
- Payne AH, Kawano A, Jaffe RB (1973) Formation of dihydrotestosterone and other 5 α -reduced metabolites by isolated seminiferous tubules and suspension of interstitial cells in a human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 37:448-453
- Payne AH, Jaffe RB (1975) Androgen formation from pregnenolone sulfate by fetal, neonatal, prepubertal and adult human testes. *J Clin Endocrinol Metab* 40:102-107
- Perkins LM, Payne AH (1988) Quantification of P450_{scc}, P450(17) α , and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice. *Endocrinology* 123:2675-2682
- Petzinger E, Wickboldt A, Pagels P, Starke D, Kramer W (1999) Hepatobiliary transport of bile acid amino acid, bile acid peptide, and bile acid oligonucleotide conjugates in rats. *Hepatology* 30:1257-1268
- Petzinger E, Kramer W (2003) Drug-targeting der Leber mittels Gallensäuren. *BIOforum* 26:514-516
- Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St Pierre MV (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3902-3912
- Platte HD, Honscha W, Schuh K, Petzinger E (1996) Functional characterization of the hepatic sodium-dependent taurocholate transporter stably transfected into an immortalized liver-derived cell line and V79 fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 70:54-60
- Rahamimoff R, Butkevich A, Duridanova D, Ahdut R, Harari E, Kachalsky SG (1999) Multitude of ion channels in the regulation of transmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:281-288
- Raman R, Das P (1991) Mammalian sex chromosomes. III. Activity of pseudoautosomal steroid sulfatase enzyme during spermatogenesis in *Mus musculus*. *Somat Cell Mol Genet* 17:429-433

- Reed MJ, Purohit A, Woo LW, Newman SP, Potter BV (2005) Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev* 26:171-202
- Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE (2009) ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 61:3-13
- Root C, Smith CD, Winegar DA, Brieady LE, Lewis MC (1995) Inhibition of ileal sodium-dependent bile acid transport by 2164U90. *J Lipid Res* 36:1106-1115
- Roth M, Araya JJ, Timmermann BN, Hagenbuch B (2011) Isolation of modulators of the liver-specific organic anion-transporting polypeptides (OATPs) 1B1 and 1B3 from *Rollinia emarginata* Schlecht (Annonaceae). *J Pharmacol Exp Ther* 339:624-632
- Ruokonen A, Laatikainen T, Laitinen EA, Vihko R (1972) Free and sulfate-conjugated neutral steroids in human testis tissue. *Biochemistry* 11:1411-1416
- Ruokonen A (1978) Steroid metabolism in testis tissue: the metabolism of pregnenolone, pregnenolone sulfate, dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in human and boar testes in vitro. *J Steroid Biochem* 9:939-946
- Saeki T, Matoba K, Furukawa H, Kirifuji K, Kanamoto R, Iwami K (1999) Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biochem (Tokyo)* 125:846-851
- Saier MH, Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:354-411
- Satsu H, Terasawa E, Hosokawa Y, Shimizu M (2003) Functional characterization and regulation of the taurine transporter and cysteine dioxygenase in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Biochem J* 375:441-447
- Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B (1998) Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am J Physiol* 274:G370-G375
- Schwartz TW, Holst B (2007) Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol Sci* 28:366-373
- Schwenk M (1987) Drug transport in intestine, liver and kidney. *Arch Toxicol* 60:37-42
- Selcer KW, Kabler H, Sarap J, Xiao Z, Li PK (2002) Inhibition of steryl sulfatase activity in LNCaP human prostate cancer cells. *Steroids* 67:821-826
- Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ (1995) Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 95:745-754
- So AY, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR (2007) Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 3:e94
- Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS (2007) Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod* 76:804-812
- Sridharan S, Brehm R, Bergmann M, Cooke PS (2007) Role of connexin 43 in Sertoli cells of testis. *Ann N Y Acad Sci* 1120:131-143

Stengelin S, Apel S, Becker W, Maier M, Rosenberger J, Bewersdorf U, Girbig F, Weyland C, Wess G, Kramer W (1996) The rabbit ileal lipid-binding protein. Gene cloning and functional expression of the recombinant protein. *Eur J Biochem* 239:887-896

Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Hochli M, Schroeder A, Meier PJ (1994) In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107:1781-1787

Sugiyama D, Kusuhara H, Shitara Y, Abe T, Sugiyama Y (2002) Effect of 17 beta-estradiol-D-17 beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab Dispos* 30:220-223

Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278:22644-22649

Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H (2005) Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12:701-720

Swaan PW, Hillgren KM, Szoka FC, Jr., Oie S (1997a) Enhanced transepithelial transport of peptides by conjugation to cholic acid. *Bioconjug Chem* 8:520-525

Swaan PW, Szoka FC, Jr., Oie S (1997b) Molecular modeling of the intestinal bile acid carrier: a comparative molecular field analysis study. *J Comput Aided Mol Des* 11:581-588

Tada Y, Wada M, Migita T, Nagayama J, Hinoshita E, Mochida Y, Maehara Y, Tsuneyoshi M, Kuwano M, Naito S (2002) Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int J Cancer* 98:630-635

Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273:251-260

Telford DE, Edwards JY, Lipson SM, Sutherland B, Barrett PH, Burnett JR, Krul ES, Keller BT, Huff MW (2003) Inhibition of both the apical sodium-dependent bile acid transporter and HMG-CoA reductase markedly enhances the clearance of LDL apoB. *J Lipid Res* 44:943-952

Tolle-Sander S, Lentz KA, Maeda DY, Coop A, Polli JE (2004) Increased acyclovir oral bioavailability via a bile acid conjugate. *Mol Pharm* 1:40-48

Tollefson MB, Vernier WF, Huang HC, Chen FP, Reinhard EJ, Beaudry J, Keller BT, Reitz DB (2000) A novel class of apical sodium co-dependent bile acid transporter inhibitors: the 2,3-disubstituted-4-phenylquinolines. *Bioorg Med Chem Lett* 10:277-279

Tollefson MB, Kolodziej SA, Fletcher TR, Vernier WF, Beaudry JA, Keller BT, Reitz DB (2003) A novel class of apical sodium co-dependent bile acid transporter inhibitors: the 1,2-benzothiazepines. *Bioorg Med Chem Lett* 13:3727-3730

Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633-671

Tremont SJ, Lee LF, Huang HC, Keller BT, Banerjee SC, Both SR, Carpenter AJ, Wang CC, Garland DJ, Huang W, Jones C, Koeller KJ, Kolodziej SA, Li J, Manning RE, Mahoney MW, Miller RE, Mischke DA, Rath NP, Fletcher T, Reinhard EJ, Tollefson MB, Vernier WF, Wagner GM, Rapp SR, Beaudry J, Glenn K, Regina K, Schuh JR, Smith ME, Trivedi JS, Reitz DB (2005) Discovery of potent, nonsystemic apical sodium-codependent bile acid transporter inhibitors (Part 1). *J Med Chem* 48:5837-5852

Ugele B, St Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P (2003) Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E390-E398

Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Maruta M, Maeda K, Harada N (2000) Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73:141-145

van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schroder FH (1992) Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50:857-861

Vassilieva EV, Nusrat A (2008) Vesicular trafficking: molecular tools and targets. *Methods Mol Biol* 440:3-14

Verkman AS, Mitra AK (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F13-F28

Visser WE, Wong WS, van Mullem AA, Friesema EC, Geyer J, Visser TJ (2010) Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol Cell Endocrinol* 315:138-145

Vlahcevic ZR, Pandak WM, Stravitz RT (1999) Regulation of bile acid biosynthesis. *Gastroenterol Clin North Am* 28:1-25, v

Wagner A, Messe N, Bergmann M, Lekhkota O, Claus R (2006) Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. *J Androl* 27:880-889

Walker WH (2009) Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 74:602-607

Webster D, France JT, Shapiro LJ, Weiss R (1978) X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency. *Lancet* 1:70-72

Weinbauer G, Luetjens C, Simoni M, Nieschlag E (2010) Physiology of Testicular Function. In Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds) *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 11-59

Weinman SA (1997) Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters. *Yale J Biol Med* 70:331-340

Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA (1998) Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem* 273:34691-34695

West KL, Ramjiganesh T, Roy S, Keller BT, Fernandez ML (2002) 1-[4-[4(4R,5R)-3,3-Dibutyl-7-(dimethylamino)-2,3,4,5-tetrahydro-4-hydroxy-1,1-dioxo-1-benzothiepin-5-yl]-phen-oxy]butyl]-4-aza-1-azoniabicyclo[2.2.2]octane methanesulfonate (SC-435), an ileal apical sodium-codependent bile acid transporter inhibitor alters hepatic cholesterol metabolism and lowers plasma low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 303:293-299

West KL, Zern TL, Butteiger DN, Keller BT, Fernandez ML (2003) SC-435, an ileal apical sodium co-dependent bile acid transporter (ASBT) inhibitor lowers plasma cholesterol and reduces atherosclerosis in guinea pigs. *Atherosclerosis* 171:201-210

Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 269:1340-1347

Wong MH, Oelkers P, Dawson PA (1995) Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* 270:27228-27234

Zelano J, Mikulovic S, Patra K, Kuhnemund M, Larhammar M, Emilsson L, Leao R, Kullander K (2012) The synaptic protein encoded by the gene *Slc10A4* suppresses epileptiform activity and regulates sensitivity to cholinergic chemoconvulsants. *Exp Neurol* 239C:73-81

Zhang EY, Phelps MA, Banerjee A, Khantwal CM, Chang C, Helsper F, Swaan PW (2004) Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry* 43:11380-11392

Zheng X, Ekins S, Raufman JP, Polli JE (2009) Computational models for drug inhibition of the human apical sodium-dependent bile acid transporter. *Mol Pharm* 6:1591-1603

Zollner G, Trauner M (2006) Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr* 156:380-385

9 DANKSAGUNGEN

Ohne breite Unterstützung und Hilfe wäre diese vorliegende Dissertation nicht zustande gekommen.

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. Joachim Geyer für die Überlassung des Themas, seine jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft und immer „offene Tür“ und sein unermüdliches Engagement, alle Fragestellungen zu diskutieren. Durch sein mir entgegengebrachtes Vertrauen, auch eigenen Ideen nachzugehen, und seine Förderung von Kongressreisen ist mir der Spaß an der Forschung nie abhandengekommen. Lieber Achim, vielen Dank für alles!

Dem geschäftsführenden Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Dr. Ernst Petzinger, danke ich für die Möglichkeit, die Promotion an seinem Institut durchzuführen und seine Unterstützung.

Ein ganz großer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, vor allem Prof. Dr. Martin Bergmann für die Beratung in histologischen Angelegenheiten, Dr. Daniela Fietz und Sabine Günther für die mit viel Arbeit verbundene Validierung der mSoat-Expression, Alexandra Hax und Jutta Dern-Wieloch für die Einarbeitung und Hilfe in der Immunhistochemie.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. Werner Kramer (Sanofi-Aventis, Frankfurt) für die Bereitstellung des [^3H]TLCS und [^3H]TLC und des "cAsbt-*training sets*", bei Prof. Dr. Hansrüdi Glatt und Dr. Nadyia Bakhiya (DIfE, Potsdam-Rehbrücke) für die Bereitstellung des Sets sulfatierter Organosulfate und bei Herrn MSc Alakurti und Prof. Dr. Yli-Kauhaluoma, Faculty of Pharmacy, Helsinki, Finnland zur Überlassung der Betulinderivate. Für die zur Verfügung gestellten radioaktiv markierten Gallensäuren bedanke ich mich herzlich bei Alan F. Hoffmann, University of California, San Diego, USA; bei Dr. Bernhard Ugele (I. Frauenklinik, München) für die Generierung der mSoat-HEK293-Zelllinie und die Bereitstellung des [^3H]Estron-3 β -D-glucuronids und Frau Dr. Döring für die Generierung der NTCP- und ASBT-HEK293-Zelllinie und ihrer generellen Unterstützung bei allen Fragen.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Dr. Karl-Heinz Baringhaus (Sanofi-Aventis, Frankfurt) für die *in silico* Berechnung der 3D-QSAR SOAT-Pharmakophore und das Einfügen verschiedener Substanzen in diese.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Anita Neubauer für die große Hilfe und gute Zusammenarbeit bei den Inhibitionsmessungen und RNA-Isolierungen und bei Klaus Schuh für die Einarbeitung und ungemein große Hilfe in der Zellkultur bedanken.

Für die Hilfe beim Western Blot bedanke ich mich bei Regina Leidolf und Katharina Bakhaus, für die Unterstützung beim LACP bei Helene Schweigmann und für die Einarbeitung in die Dünnschichtchromatographie bei Kurt Stumpf.

Bei Prof. Dr. Ralph Brehm vom Anatomischen Institut der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover möchte ich mich für die Bereitstellung der SCCx43 Knockout-Maus Hodenschnitte und bei Prof. Dr. Gerhard Schuler, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, Gießen, für die Überlassung der Eberhoden bedanken.

Bei allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Dorothee von Schnakenburg danke ich für ihre Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten und Christoph Zimmermann für die Unterstützung bei allen technischen Problemen.
Vielen Dank an dieser Stelle an meine fleißigen Korrekturleser Sabrina Elmshäuser, Helene Schweigmann und Charlotte Straehle.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, meiner Verlobten Barbara Mannert und deren Familie, die alle mein Studium und meine Promotion immer unterstützt haben und so entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

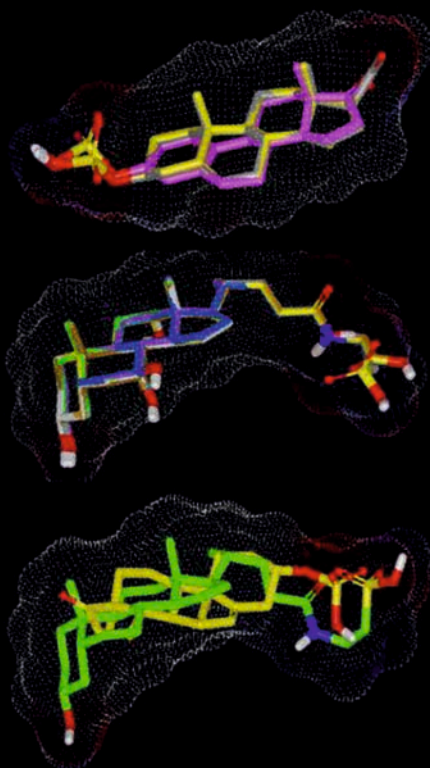
Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter SOAT: Gewebeexpression, vergleichende funktionelle Charakterisierung und Generierung einer 3D-QSAR Pharmakophore

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

.....

Gary Grosser



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
 STAUFENBERGRING 15
 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
 redaktion@doktorverlag.de
 www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5990-3

